

PRÉPARATION
DE
NOUVEAUX TYPES
D'ENZYMES IMMOBILISÉES

André RACOIS

1973
1



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550828_0009

T H E S E
présentée à la
F A C U L T E D E S S C I E N C E S D U M A N S
devant l'Université de Caen

pour obtenir
le grade de
D O C T E U R E S S C I E N C E S P H Y S I Q U E S
(Chimie Organique)

par
André RACOIS

P R E P A R A T I O N
D E N O U V E A U X T Y P E S
D ' E N Z Y M E S I M M O B I L I S E E S

Soutenue le 6 Juillet 1973

JURY : M.M. C.P. PINAZZI

Président

J. MONTREUIL
J. LEVISALLES
A. THUILLIER
E. BROWN

Examineurs



Ce travail a été effectué au Laboratoire de Synthèse Organique du Centre Universitaire du Mans sous la direction de Monsieur le Professeur E. BROWN.

Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde gratitude pour la sollicitude avec laquelle il m'a accueilli et guidé, et pour le grand intérêt qu'il a toujours porté à mes travaux.

Je prie Monsieur le Professeur C.P. PINAZZI de croire à ma respectueuse reconnaissance pour m'avoir fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Ma gratitude va également à Monsieur le Professeur J. MONTREUIL de la Faculté des Sciences de Lille, à Monsieur le Professeur J. LEVISALLES de la Faculté des Sciences de Paris VI et à Monsieur le Professeur A. THUILLIER de la Faculté des Sciences de Caen qui ont aimablement accepté de juger ce travail.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire et le personnel des différents services qui, de près ou de loin, m'ont soutenu par leur amitié, leurs suggestions ou leur aide.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur H. GUENIEFFY, Maître-Assistant au Collège Scientifique Universitaire du Mans, pour ses nombreux conseils et sa sollicitude de tous les jours.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR E. B R O W N

"Ce qui sauve, c'est de faire un pas, puis un autre"

SAINT-EXUPERY

A MA FEMME

"Ce que deux veulent n'échoue pas"

OVIDE

TABLE DES MATIERES

I - GENERALITES SUR LES ENZYMES IMMOBILISEES

1) Introduction	p. 1
2) Techniques d'immobilisation	p. 2
3) Bibliographie	p. 15

II - PROPRIETES DES ENZYMES IMMOBILISEES

Bull. Soc. chim. Fr., sous presse

1) Taux de fixation	p. 20
2) Activité	p. 23
3) Vitesse de réaction	p. 30
4) Constante de MICHAELIS-MENTEN	p. 30
5) Activité en fonction du pH	p. 31
6) Résistance à la dénaturation	p. 33
7) Utilisation	p. 33
8) Conclusion	p. 41
9) Bibliographie	p. 42

III - TRADUCTION JAPONAISE DE LA MISE AU POINT PUBLIEE DANS

Bull. Soc. chim. Fr., 1971, (12), 4613 p. 47

IV - PREPARATION DE NOUVEAUX SUPPORTS MACROMOLECULAIRES

LES POLYMETHACRYLATES D' ω IODO-n-ALCOYLE (POLIODALS)

Bull. Soc. chim. Fr., 1971, (12), 4341

1) Synthèse des polymères	p. 53
2) Etude physique des polymères	p. 55
3) Partie expérimentale	p. 56
4) Bibliographie	p. 62

V - PREPARATIONS ET PROPRIETES DE DERIVES INSOLUBLES DE L'UREASE
ET DE LA TRYPSINE, Bull. Soc. chim. Fr., 1971, (12), 4351

1) Introduction et partie théorique	p. 63
2) Conclusion	p. 65
3) Partie expérimentale :	
a) uréase	p. 65
b) trypsine	p. 67
4) Bibliographie	p. 68

VI - PREPARATIONS ET PROPRIETES DE DERIVES INSOLUBLES DU
CHYMOTRYPSINOGENE-A ET DES CHYMOTRYPSINES α et δ ,

Bull. Soc. chim. Fr., 1971, (12), 4357

1) Préparation de dérivés insolubles	p. 70
2) Conclusion	p. 72
3) Partie expérimentale	p. 72
4) Bibliographie	p. 75

VII - EMPLOI DES VANACRYLS DANS LA PREPARATION DE NOUVEAUX
DERIVES INSOLUBLES DE LA TRYPSINE,

Tetrahedron, sous presse

1) Synthèse des polymères	p. 77
2) Etude physique des polymères	p. 79
3) Préparation de dérivés de la trypsine	p. 81
4) Conclusion	p. 90
5) Partie expérimentale	p. 92
6) Bibliographie	p. 106

VIII - EMPLOI DES VANACRYLS DANS LA PREPARATION DE NOUVEAUX
DERIVES INSOLUBLES DE L'UREASE,

Tetrahedron, sous presse

1) Partie théorique	p. 109
2) Conclusion	p. 116
3) Partie expérimentale	p. 117
4) Bibliographie	p. 126

IX - IMMOBILISATION DE LA TRYPSINE SUR DES POLYMERES POSSEDANT
DES GROUPEMENTS bis(β -CHLOROETHYL) AMINO

1) Synthèse des polymères	p. 129
2) Immobilisation de la trypsine	p. 132
3) Conclusion	p. 135
4) Partie expérimentale	p. 136
5) Bibliographie	p. 143

X - TABEAU COMPARATIF DE L'IMMOBILISATION DE LA TRYPSINE
SUR DIVERS POLYMERES REACTIFS

p. 144

GENERALITES SUR LES
ENZYMES IMMOBILISEES

La production des enzymes, en vue de leur utilisation par les diverses industries du textile, du papier, des produits alimentaires et pharmaceutiques, prend une importance tous les jours plus grande. On évalue à plusieurs milliards de nouveaux francs le chiffre d'affaires de l'industrie des enzymes (1).

La plupart des enzymes utilisées, tant dans les ateliers de production que dans les laboratoires d'analyse, de contrôle ou de recherche, sont solubles dans l'eau, ce qui rend leur récupération impossible en fin de réaction (2). Pour différentes raisons, y compris la valeur marchande élevée des enzymes, on a cherché depuis plusieurs années des moyens de récupérer ces dernières après usage. Une méthode désormais classique pour parvenir à ce but consiste à rendre l'enzyme insoluble par un traitement physique ou chimique convenable, suffisamment doux et sélectif pour éviter une perte trop importante d'activité biologique. L'enzyme ainsi insolubilisée peut catalyser, en milieu hétérogène cette fois, les réactions susceptibles de l'être en phase homogène par l'enzyme soluble initiale. Le dérivé insoluble est ensuite récupéré par filtration ou centrifugation et peut servir à nouveau pour le même genre de réactions (2).

Il paraît difficile de faire une étude critique et comparée des divers procédés utilisés pour insolubiliser les enzymes. Du fait de la fragilité particulière des enzymes, liée à la complexité de leurs structures, on ne peut affirmer en toute certitude que la technique d'insolubilisation utilisée est seule responsable de la dénaturation plus ou moins importante observée chez la grande majorité des "enzymes insolubilisées". Il existe en effet de nombreux facteurs capables de provoquer ou augmenter cette dénaturation, tels que le caractère hydrophile du support, la température, le pH, le vieillissement, les modifications de la structure moléculaire et la présence de composés organiques ou minéraux qui entraînent une inhibition souvent irréversible. Lors de l'insolubilisation, tous ces facteurs interviennent simultanément quoique de façon variable et souvent non reproductible, et de ce fait, les conclusions définitives doivent être formulées avec circonspection. Pour cette raison, nous allons dans ce qui suit décrire brièvement, sans chercher à les comparer entre elles, les principales techniques de préparation des "enzymes immobilisées".

TECHNIQUES D'IMMOBILISATION DES ENZYMES.

Six méthodes d'immobilisation peuvent être distinguées. Elles font intervenir l'adsorption de l'enzyme à la surface d'une résine solide, sa fixation sur des résines échangeuses d'ions, son insertion dans un gel hydrophile, sa "précipitation" par pontage au moyen d'un agent de réticulation ou par polymérisation, ou encore sa fixation par liaison covalente sur un support minéral ou organique.

1. Adsorption

Cette technique paraît être la plus ancienne ; elle présente sans doute aussi le plus d'avenir pour la purification des enzymes et de leurs inhibiteurs, ou des antigènes et des anticorps. La fixation des molécules sur le support est réversible, en accord avec les lois de la physisorption.

Ainsi diverses enzymes ont pu être fixées par physisorption soit sur des supports minéraux tels que le verre (3,4), le phosphate de calcium (5), le charbon actif (6), l'hydroxylapatite (5), la kaolinite (7), l'argile (8), la brique pilée (9), ou l'alumine, soit sur des supports organiques comme la cellulose (10) ou une membrane de collodion (11). Le pouvoir de rétention du support envers l'enzyme est fonction du traitement subi au préalable par ce support (12). En général l'activité de l'enzyme reste très grande bien qu'il puisse y avoir "dénaturation de surface" des protéines. La désorption peut se produire par simple changement de pH, de température, de force ionique ou même de pression (dans le cas de percolation en continu dans une colonne). La présence de particules chargées - par exemple les molécules de substrat - peut également suffire à chasser l'enzyme du support.

2. Fixation sur des résines échangeuses d'ions.

Les enzymes peuvent être retenues sur un support chargé insoluble au moyen de liaisons ioniques. Ainsi, diverses enzymes (catalase, pepsine, glucoamylase...) ont été fixées soit sur des polymères anioniques dérivés de la diéthylaminoéthyl (DEAE)-cellulose (13,14) ou du Dowex-2 (4), soit sur des polymères cationiques comme la carboxyméthyl (CM)-cellulose (15), la phosphate-cellulose (15), la citrate-cellulose (15) ou le Dowex -50 (4).

La fixation est due au caractère polyélectrolytique et amphotère des protéines. L'enzyme reste fixée sur le polymère pour des valeurs du pH et de la force ionique bien déterminées ; elle peut ensuite être récupérée intacte en modifiant ces facteurs (14).

La fixation par liaisons ioniques ressemble à celle des enzymes in vivo dans les cellules de l'organisme. Ce mode d'insolubilisation doit permettre une approche de la compréhension des mécanismes cellulaires (13, 16 et 17).

3. Insertion dans un gel insoluble.

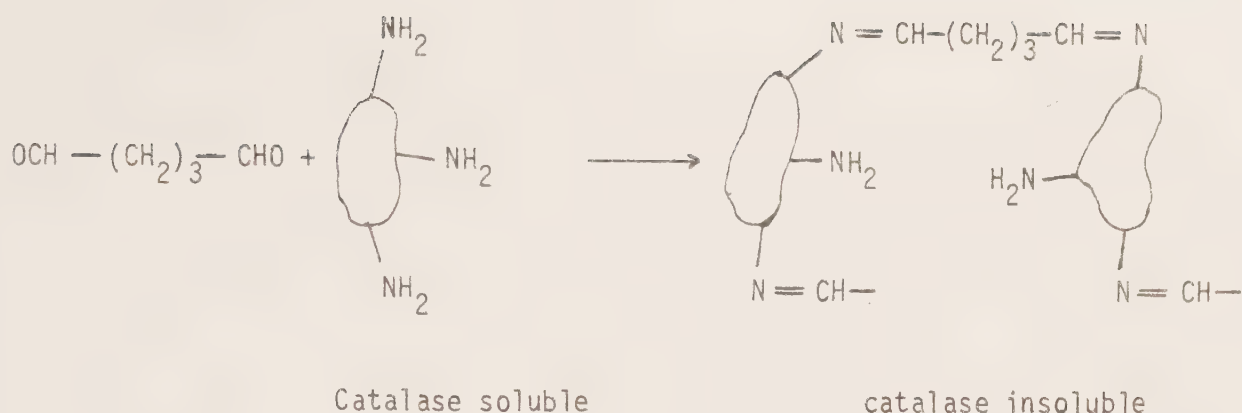
Si on effectue la polymérisation en émulsion d'un monomère en présence d'une enzyme telle que la trypsine ou la chymotrypsine, le gel obtenu emprisonne une certaine quantité d'enzyme ; celle-ci conserve une grande partie de son pouvoir catalytique car les sites actifs ne sont pas dénaturés (18). Ces gels sont généralement des polyamides hydrophiles qui peuvent être liés à des matrices hydrophobes (19 et 20). L'enzyme utilisée est soit une protéase (21), soit une enzyme à groupement prosthétique (22). On a également utilisé des nitrates et acétates de cellulose (20), du dextran (Séphadex) (23), de l'amidon avec du polyuréthane (24). L'uréase et la catalase ont été "enfermées" dans de petites capsules semiperméables de polystyrène, d'éthylcellulose ou de silicones (25 et 26).

Cette méthode d'immobilisation n'est valable que pour les enzymes transformant des substrats de faible masse car les substrats macromoléculaires ne peuvent pas passer à travers les pores du gel pour atteindre l'enzyme emprisonnée (27 et 28).

Les gels formés sont plus ou moins durs, ce qui peut empêcher leur utilisation en continu dans des colonnes. Des travaux récents ont permis d'obtenir des perles dures de polyméthacrylate d'hydroxybutane (28) et de polyméthacrylamide (29) contenant de la trypsine active.

4. Pontage par un agent de réticulation.

Certaines enzymes en solutions ou en suspensions aqueuses ont été précipitées par réticulation au moyen d'un réactif à deux ou plusieurs groupements fonctionnels qui lient les molécules d'enzyme soit entre elles, soit à un support macromoléculaire, augmentant ainsi la masse moléculaire et diminuant la solubilité. Le réactif le plus utilisé actuellement est le glutaraldéhyde qui réagit sur les groupements aminés libres de l'enzyme selon le schéma probable suivant (30) :



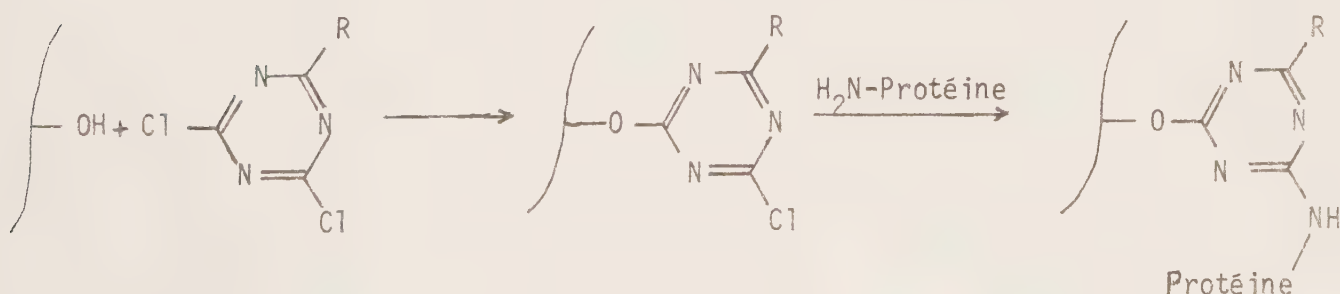
Le glutaraldéhyde peut également réagir sur d'autres fonctions, comme des hydroxyles, liant l'enzyme à un support cellulosique (31 et 32). Ce type de réaction n'est pas bien défini.

Les réactifs utilisés pour le pontage sont très variés ainsi que le montrent les exemples suivants :

- La N,N-méthylène bis-acrylamide a été employée pour lier une déshydrogénase à un gel polyamide (21).

- La bis-diaz-o-dianisidine peut réagir sur les groupements $-\text{NH}_2$ libres de la glucose-oxydase, ce qui a permis de fixer cette dernière sur de la cellulose ou du papier pour chromatographie (33). De façon analogue, la bis-diazobenzidine (ou son dérivé disulfonique) a permis de lier des protéines à de la cellulose (34 et 35).

- La trichloro-2,4,6-s-triazine et la dichloro-2,4-(carboxyméthylamino)-6-s-triazine utilisées avec la cellulose ou le Sephadex (polysaccharide), ont donné des dérivés insolubles de la chymotrypsine (32 et 36).



Récemment certains silanes de formule générale $\text{R}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OMe})_3$ (avec $\text{R} = \text{NH}_2, \text{CO}, \text{SH}, \text{etc.}$) ont été employés pour lier des hydroxylases, oxydoréductases et transférases à des supports minéraux (37 et 38).

- Divers diacides, diamides et dérivés de l'acide cyanurique ont permis de fixer la streptokinase sur un polysaccharide (Dextran) (39).

- L'addition de lignine préalablement traitée à une solution d'enzyme (trypsine, amylase) a fourni une combinaison solide enzyme-lignine conservant plus de 80 % de l'activité de l'enzyme (40).

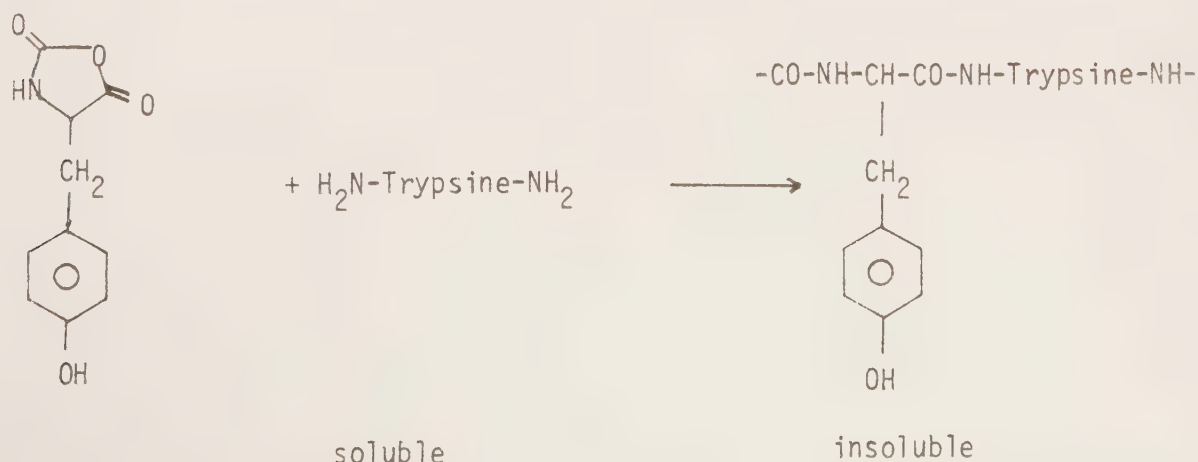
Avec cette méthode d'immobilisation, on peut moduler le taux de réticulation du réseau tridimensionnel, ce qui permet d'obtenir des dérivés plus ou moins solubles. Ces dérivés présentent le gros avantage d'avoir peu de parties hydrophobes mais, par contre, ils ont de mauvaises propriétés mécaniques, sont biodégradables et n'amènent qu'une faible stabilisation de l'enzyme.

5. Polymérisation de l'enzyme.

Cette méthode ne nécessite pas de support plus ou moins hydrophile pour immobiliser l'enzyme. Ainsi l'activité enzymatique résiduelle (AER) des dérivés est en général bonne. On retrouve malheureusement les mêmes inconvénients qu'avec la méthode précédente.

A l'aide d'un réactif approprié les molécules protéiques sont polymérisées pour donner des produits de grandes masses moléculaires peu solubles dans l'eau. En 1948, SUMNER (41) obtint une uréase insoluble par addition de chlorure de sodium à une solution neutre d'uréase dans l'alcool. Il semble que la réticulation se fasse par formation de ponts disulfures intermoléculaires (42). Par réaction avec le réactif de Woodward (le *N*-éthylphényl-5 isoxazolium-sulfonate-3'), la chymotrypsine a donné un polymère contenant 14 molécules d'enzyme initiale (43).

De façon semblable, la trypsine a fourni une combinaison insoluble et biologiquement active par polycondensation avec un dérivé de la tyrosine (44) :

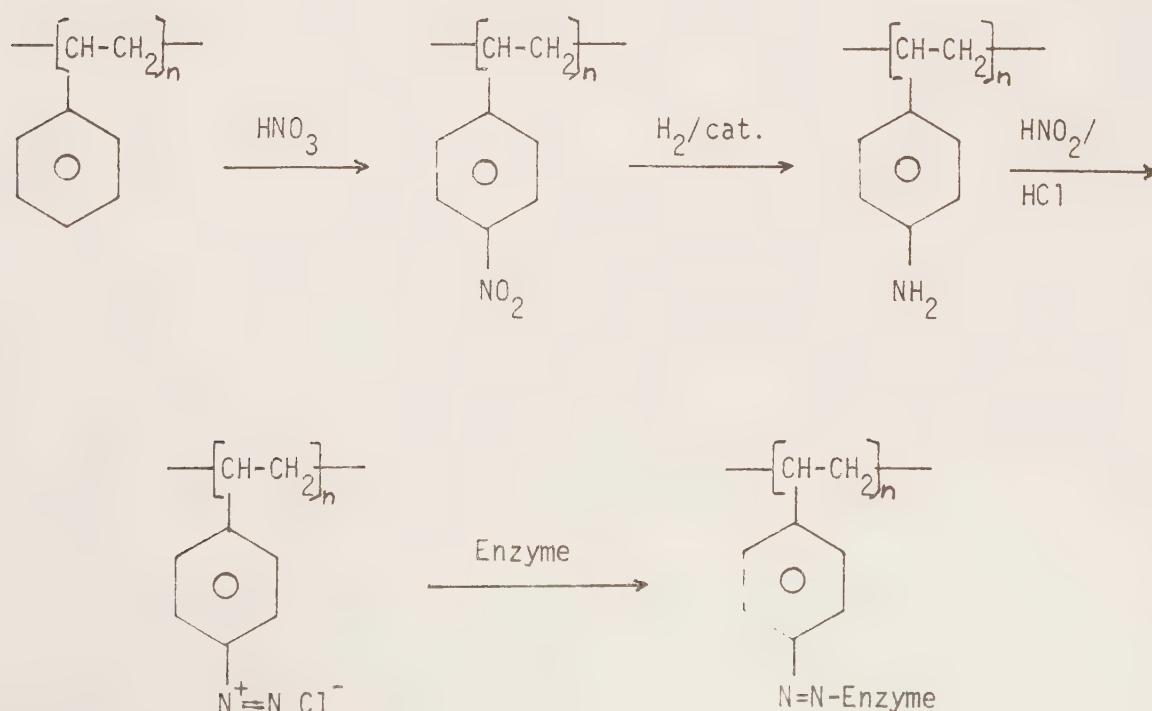


La chymotrypsine et la trypsine ont fourni, avec la L-ornithine, des Poly (L-ornithine-enzyme) contenant de trente à cinquante résidus ornithines par molécule d'enzyme (45).

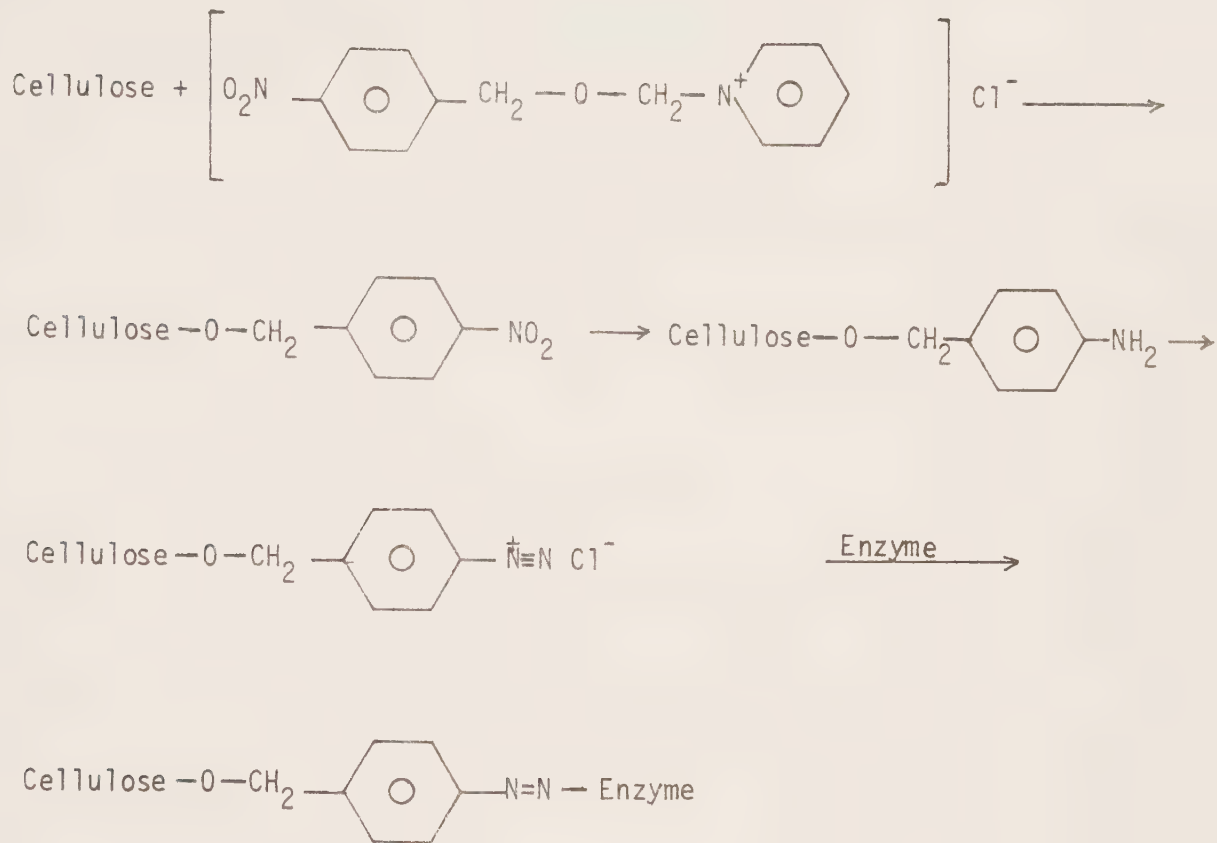
6. Fixation sur un polymère au moyen de liaisons covalentes.

La technique la plus utilisée actuellement pour immobiliser une enzyme consiste à lier cette dernière à des supports organiques ou minéraux par liaisons covalentes. Un grand nombre de combinaisons chimiques solides enzyme-support macromoléculaire sont maintenant connues, ainsi d'ailleurs qu'un certain nombre de combinaisons antigène-support macromoléculaire insolubles et biologiquement actives. Dans la majorité des cas l'enzyme greffée sur le polymère est une protéase (pepsine, papaïne, trypsine, chymotrypsine, ...) et le support macromoléculaire est souvent un polymère possédant des cycles aromatiques aminés (2 et 46). Après diazotation, ce polymère est amené à réagir sur les cycles phénoliques de la tyrosine ou les groupements imidazoles de l'histidine (47) contenus dans les enzymes. Il semblerait que Campbell (48) ait été le premier à utiliser cette méthode. Dans la littérature, on trouve des préparations de dérivés insolubles :

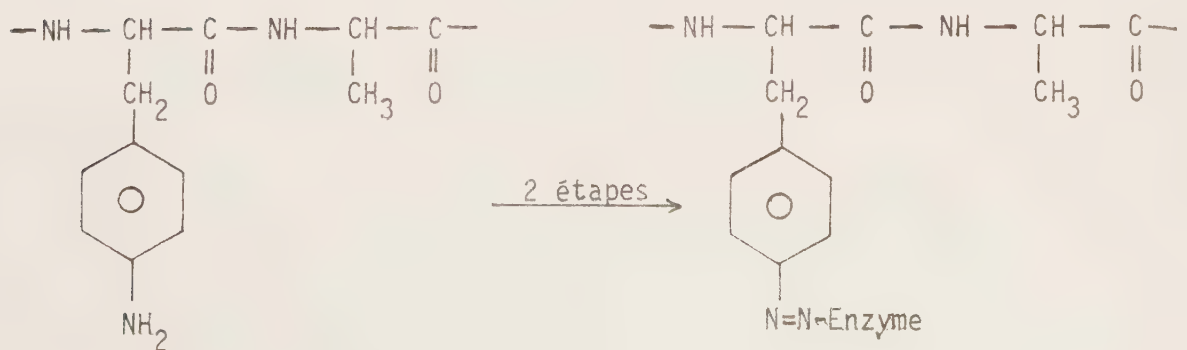
- De la pepsine et de la carboxypeptidase par greffage de ces enzymes sur du para-aminopolystyrène diazoté (49) :



- de la trypsine et de la chymotrypsine par combinaison avec la diazobenzylcellulose (17) :



- de l'uréase, de la trypsine (42) et de la pronase (50) par greffage sur des copolymères de para-diazophénylalanine et d'acides aminés simples (L-leucine, glycine, L-alanine, etc...) :



Le groupement diazoïque n'est pas le seul groupement fonctionnel qui ait été utilisé pour lier de façon covalente un polymère à une enzyme ou une protéine. Ainsi, notamment, il a été fixé des enzymes et des protéines sur des polymères possédant des groupements :

1) - azotures d'acyle (17, 51 à 54) :

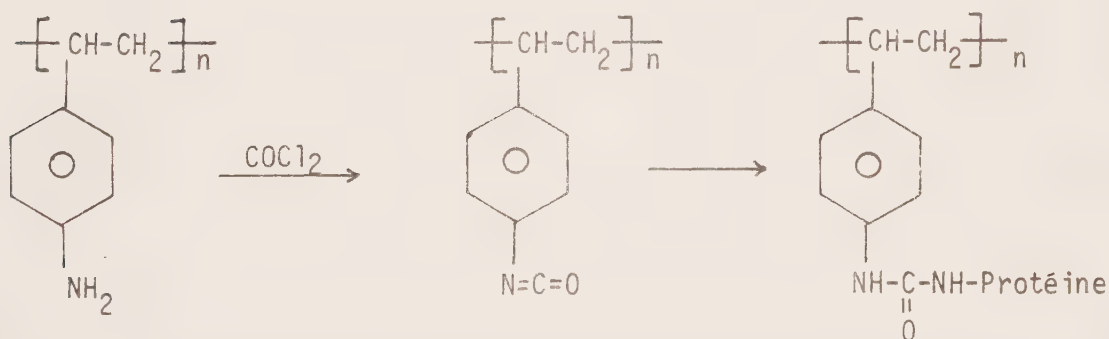


2) - chlorures d'acide (55 et 56) :



Le polymère est en général un polystyrène réticulé par du divinyl benzène (Amberlite).

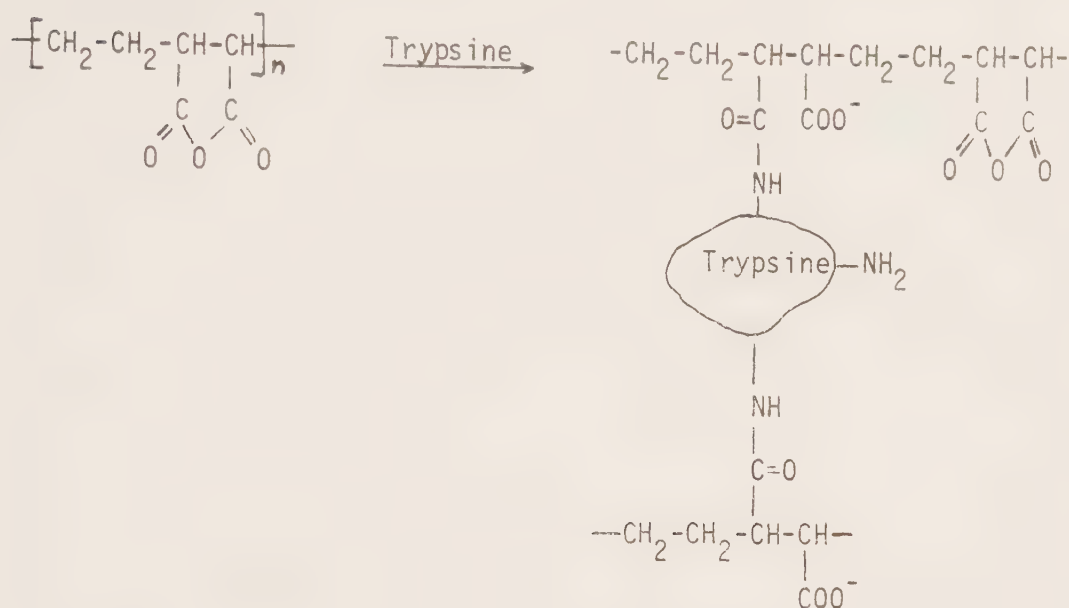
- isocyanates (2, 57 et 58) :



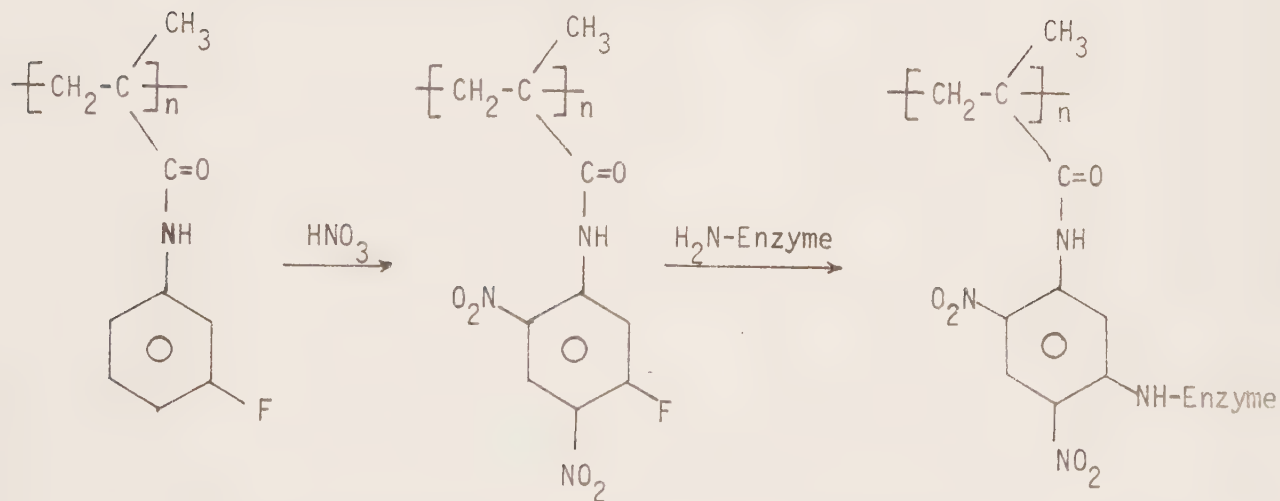
- isothiocyanates fixés sur le gel Sephadex (59 et 60) ou sur du styrène (61) :



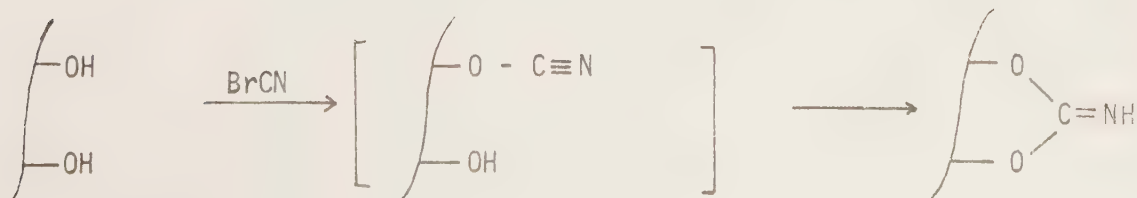
3) - anhydrides d'acide maléique-éthylène (62 et 63), anhydride maléique-butanedioldivinyl éther (64) ou anhydride méthacrylique (65) :

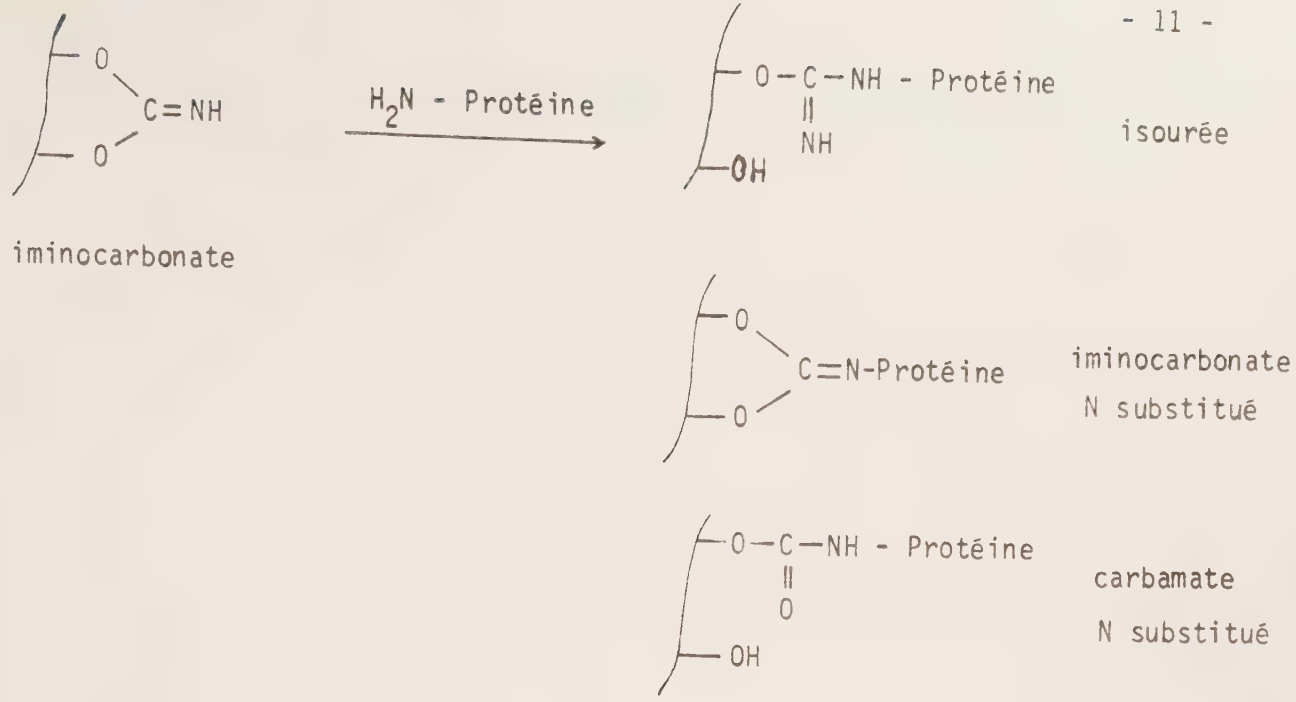


4) - fluorures de nitroaryles (61 et 66) :

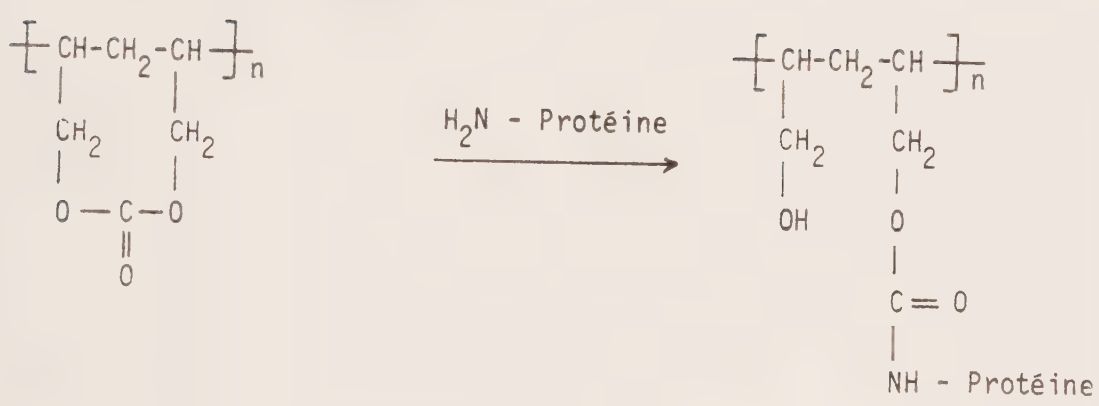


5) - iminocarbonates, obtenus en faisant réagir du bromure de cyanogène sur un polyol macromoléculaire (Séphadex, agarose ou cellulose) (60, 67 et 68):

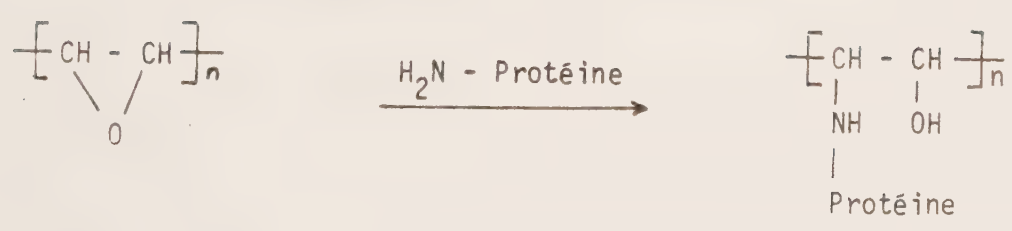




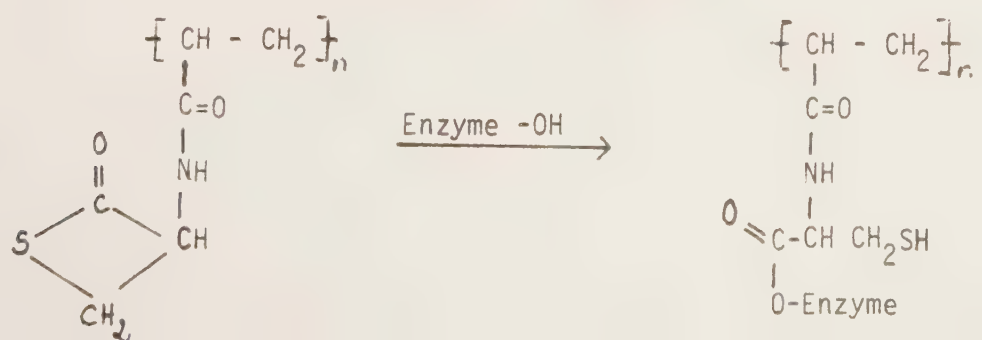
6) Carbonates (69) :



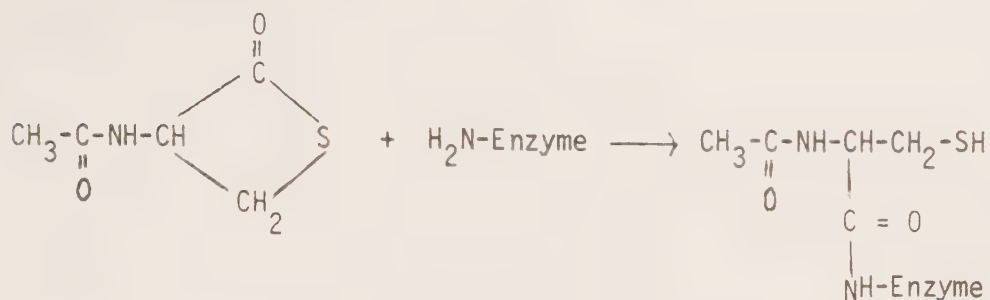
7) oxiranes (70) :



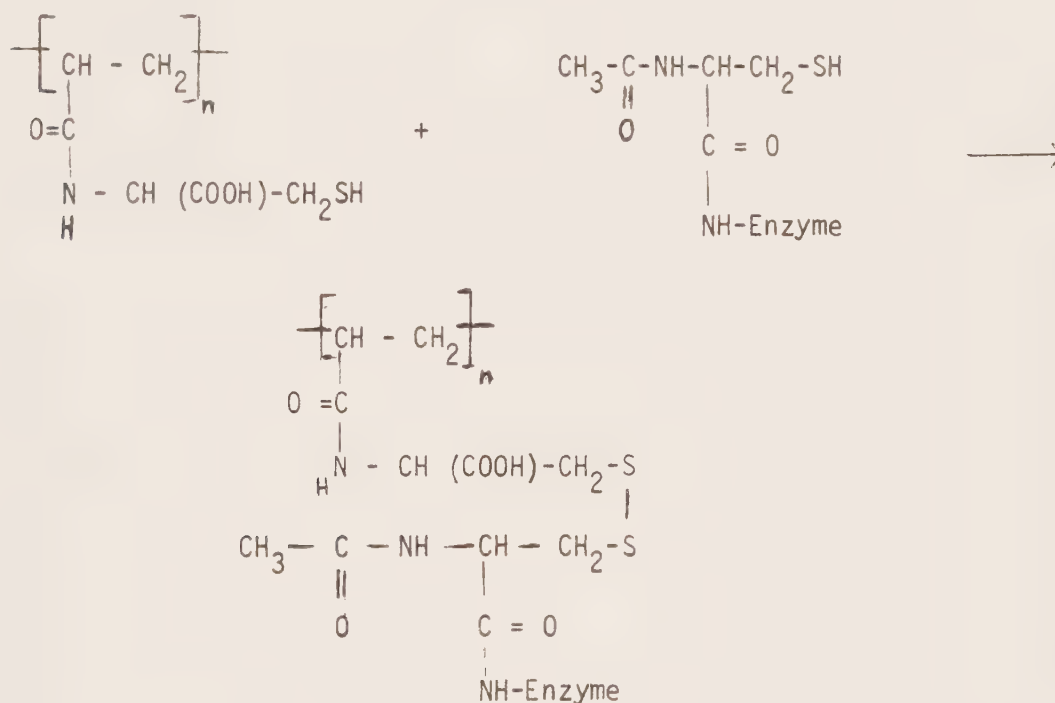
8) polythiols et polythiolactones commercialisés (71) qui réagissent sur les enzymes selon les schémas probables :



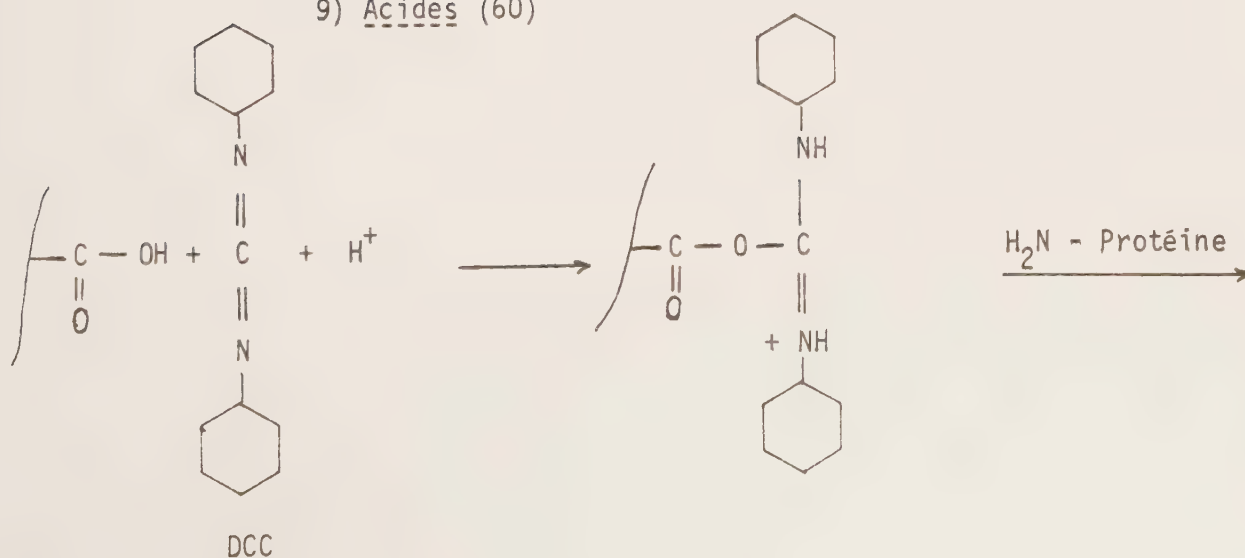
Avant fixation sur le polythiol, l'enzyme est d'abord "activée" par l'immunothiol ce qui lui permet d'acquérir des groupes - SH libres si elle en est dépourvue.

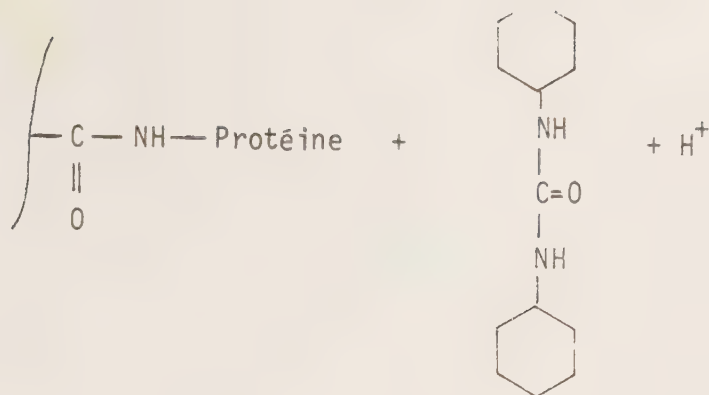


Ce dérivé réagit ensuite sur le polythiol en milieu oxydant avec formation de ponts disulfures :



9) Acides (60)

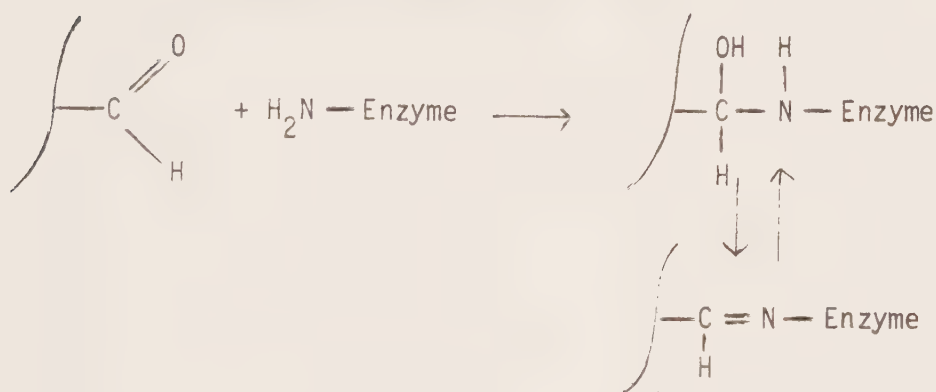




Le réactif de Woodward est un agent de réticulation qui a servi à fixer la trypsine et la chymotrypsine sur un copolymère de L-alanine et d'acide L-glutamique. Le pontage se fait également par formation de liaisons amides entre les carboxyles du polymère et les -NH_2 libres de l'enzyme (72).

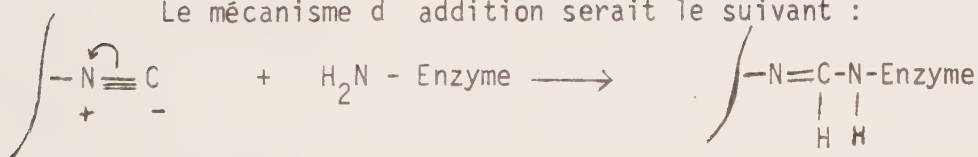
10) Amines susceptibles de réagir, en présence de DCC, avec des protéines "acides" (73) à l'inverse de la réaction précédente.

11) Aldéhyde aliphatique (73 à 75).



12) Isonitrile (73)

Le mécanisme d'addition serait le suivant :



Ces divers groupements fonctionnels réagissent sur les groupements amines libres en position ϵ de la lysine, imines du tryptophane, amides de l'asparagine ou de la glutamine, hydroxyles aliphatiques de la sérine ou de la thréonine, thiols de la cystéine, ou méthylthiols de la méthionine, guanidyles de l'arginine, les cycles phénoliques de la trypsine ou amidazoles de l'histidine (2,76 à 78).

Récemment ont été obtenus, par irradiation γ ou X des dérivés actifs de la trypsine fixée sur du polyuréthane ou du coton en présence ou non de monomères acrylamides (79).

En général les groupements réactifs font partie de l'enzyme ou du support ; sinon ils peuvent y être introduits par des réactions d'addition. Les liaisons obtenues sont stables ; les dérivés ont de bonnes propriétés mécaniques surtout lorsque le support est sous forme de perles ; il existe une grande liberté de choix des supports et du mode de fixation pour chaque enzyme, ce qui permet théoriquement de trouver les conditions optimales d'immobilisation. Mais les supports sont plus ou moins biodégradables et dénaturent d'autant plus l'enzyme qu'ils sont moins hydrophiles. La fixation est réalisée la plupart du temps en milieu aqueux tamponné avec un pH voisin de 7 ou du point isoélectrique de l'enzyme, afin de réduire la dénaturation et afin d'être dans les meilleures conditions de réactivité. On peut noter une tendance récente à l'emploi de solvants organiques comme le méthylchloroforme (80), le toluène, le benzène ou le xylène (81 et 82), le diméthylsulfoxyde (83) (ce dernier sert à décolorer l'enzyme et son dérivé insoluble). Il est à noter que les solvants organiques peuvent entraîner une augmentation de la constante de Michaelis de l'enzyme de façon très appréciable, ainsi que cela a été constaté pour la chymotrypsine il y a déjà plusieurs années (84).

B I B L I O G R A P H I E

- 1) D.N. KRAMER et R. FORD, Sci. Technol., 1967, 64, 70.
- 2) I.H. SILMAN et E. KATCHALSKI, Ann. Rev. Biochem., 1965, 35, part II, 873.
- 3) W.N. ARNOLD, Arch. Biochem. Biophys., 1966, 113, 451.
- 4) L.B. BARNETT et H.B. BULL, Biochim. Biophys. Acta, 1959, 36, 244.
- 5) C. SCHWABE, Biochemistry, 1969, 8, 795.
- 6) J.M. NELSON et D.J. HITCHOCK, J. amer. chem. Soc., 1921, 43, 1956.
- 7) A.D. Mc LAREN et E.F. ESTERMANN, Arch. Biochem. Biophys., 1956, 61, 158.
- 8) A. KIMURA, H. SHIRARAKI et S. USAMI, Chem. Abstr., 1969, 71, 9899 y.
- 9) P. MONSAN et G. DURAND, Compt. Rend. Acad. Sci., 1971, 273 (I), 33.
- 10) E.T. REESE et M. MANDELS, J. amer. chem. Soc., 1958, 80, 4625.
- 11) R. GOLDMAN, I.H. SILMAN, S.R. CAPLAN, O. KEDEM et E. KATCHALSKI, Science, 1965, 150, 758.
- 12) I. LANGMUIR et V.J. SCHAEFER, J. amer. chem. Soc., 1938, 60, 1351.
- 13) M.A. MITZ, Science, 1956, 123, 1076.
- 14) K.L. SMILEY, Chem. and Eng. News, 28 septembre 1970, 54.
- 15) M.A. MITZ et R.J. SCHLUETER, J. amer. chem. Soc., 1959, 81, 4024.
- 16) E.M. CROOK, Biochem. J., 1968, 107, 1 P.
- 17) M.A. MITZ et L.J. SUMMARIA, Nature, 1961, 189, 576.
- 18) P. BERNFELD, R.E. BIEBER et P.C. Mac DONNELL, Arch. Biochem. Biophys., 1968, 127, 779.
- 19) H.D. BROWN, A.B. PATEL et S.K. CHATTOPADHYAY, J. Biomed. Mater. Res., 1968, 2 (2), 231.
- 20) P. BERNFELD et J.WAN, Science, 1963, 142, 678.
- 21) G.P. HICKS et S.J. UPDIKE, Anal. Chem., 1966, 38 (6), 726.
- 22) S. AMOTZ, Brevet Allemand n° 1959164, 4 juin 1970 ; Chem. Abstr., 1970, 73, 31926t
- 23) E.W. CHAPPELLE, E. Jr RICH et N.H. Mac LEOD, Science, 1967, 155, 1287.
- 24) E.K. BAUMAN, L.H. GOODSON, G.G. GUILBAULT et D.N. KRAMER, Anal. Chem., 1965, 37, 1378.

- 25) M. KITAJIMA, S. MIYANO et A. KONDO, Kogyo Kagaki Zasshi, 1969, 72 (2), 493 ; Chem. Abstr., 1969, 70 (26), II8067 a.
- 26) T.M. CHANG et M.J. POZNANSKI, Nature, 1968, 218, 243.
- 27) H.D. ORTH et W. BRÜMMER, Angew. Chem., 1972, II (4) , 249.
- 28) K.F. O'DRISCOLL, Chem. & Eng. News, 4 septembre 1972, 17.
- 29) H. NILSSON, R. MOSBACH et K. MOSBACH, Biochim. Biophys. Acta, 1972, 268 (1), 253.
- 30) A. SCHEJTER et A. BAR-ELI, Arch. Biochem. Biophys., 1970, 136 (2), 325.
- 31) G. BROUN, E. SELEGNY, S. AVRAMEAS et D. THOMAS, Biochim. Biophys. Acta, 1969, 185, 260.
- 32) G. KAY et M.D. LILLY, Biochem. Biophys. Acta, 1970, 198, 276.
- 33) E. SELEGNY, S. AVRAMEAS, G. BROUN et D. THOMAS, Compt. Rend. Acad. Sci., 1968, 266 (19), I431.
- 34) E.R. ARQUILA et C. COBLENCÉ, Anat. Record, 1960, 138, 203.
- 35) R. GOLDMAN, I.H. SILMAN, S.R. CAPLAN, O. KEDEM et E. KATCHALSKI, Science, 1965, 150, 758.
- 36) E.M. CROOK et G. KAY, Brevet Sud Africain n° 6 804 010, 12 novembre 1968 ; Chem. Abstr., 1969, 71, I4 363 y.
- 37) R.A. MESSING et M.M. WEETALL, Brevet Allemand n° I 944 418, 1970 ; Chem. Abstr., 1970, 72, 63077 n.
- 38) J.H. REYNOLDS et R.E. MILLER, Brevet Allemand n° 2 106 214, 19 août 1971 ; Chem. Abstr., 1971, 75, I08 529 s.
- 39) L.G. GINGER et A.N. MATHER, Brevet Allemand n° 2059165, 9 Juin 1971 ; Chem. Abstr., 1971, 75, 95 019 y.
- 40) J.S. WALLERSTEIN et R.T. ALBA, Brevet U.S. n° 2 452 000, 19 octobre 1948 ; Chem. Abstr., 1949, 43, I451 c.
- 41) J.B. SUMNER, Science, 1948, 108, 410.
- 42) E. RIESEL et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1964, 239, I521.
- 43) R.P. PATEL et S. PRICE, Biopolymers, 1967, 5, 583.
- 44) A.N. GLAZER, A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1962, 237, I832.
- 45) M. PECHT et Y. LEVIN, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 46 (6), 2054.
- 46) H.R. MAHLER et E.H. CORDES, Biological Chemistry, Harper & Row, London , 1967, p. 278.
- 47) référence 46, p. 12.
- 48) D.H. CAMPBELL, E. LUESCHER et L.S. LERMAN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1951, 37, 575.

- 49) N. GRUBHOFFER et L. SCHLEITH, Z. physiol. Chem., 1954, 297, 108.
- 50) P. CRESSWELL et A.R. SANDERSON, Biochem. J., 1970, 119, 447.
- 51) F. MICHELL et J. EVERS, Makromol. Chem., 1949, 3, 200.
- 52) Y. OHNO et M.E. STAHMANN, Brevet Japonais n° 7 006 875, 1970 ; Chem. Abstr., 1970, 73, 10 965 q.
- 53) S.A. BARKER, P.J. SOMERS, R. EPTON et J.V. Mac LAREN, Carbohydrate Res., 1970, 14 (3) , 28.
- 54) W.E. HORNBY et H. FILIPPUSON, Biochem. Biophys. Acta, 1970, 220 (2), 343.
- 55) K. MAEKAWA, Brevet Japonais n° 6 810 986, 9 mai 1968 ; Chem. Abstr., 1968, 69, 83 703 e.
- 56) N. GRUBHOFFER et L. SCHLEITH, Naturwissenschaften, 1953, 40, 508.
- 57) H. BRANDENBERGER, J. Polym. Sci., 1956, 20, 215.
- 58) G. MANECKE, Biotechnol. & Bioeng., Symp. N° 3, 1972, 185.
- 59) R. AXEN et J. PORATH, Acta chem. scand., 1964, 18, 2193.
- 60) K. MOSBACH, Sci. Amer., 1971, 224 (3) , 26.
- 61) G. MANECKE, G. GUNZEL et H.J. FORSTER, J. Polym. Sci., 1970, 30, 607.
- 62) Y. LEVIN, M. PECHT, L. GOLDSTEIN et E. KATCHALSKI, Biochem., 1964, 3 (12), 1905.
- 63) H. BRANDENBERGER, Helv. chim. Acta., 1957, 40, 61.
- 64) W. BRUEMOER, N. HENNRICH, M. KLOCKOW, H. LANG et H.D. ORTH, Eur. J. Biochem., 1972, 25 (1), 129.
- 65) A. CONTE et K. LEHMAN, Chem. Abstr., 1971, 75, 15 311 z.
- 66) G. MANECKE et H.J. FOERSTER, Makromol. Chem., 1962, 51, 199.
- 67) R. AXEN, P. MYRIN et J.C. JANSON, Biopolymers, 1970, 9, 401.
- 68) R. AXEN, J.O. PORATH et S. ERNBACK, Nature, 1967, 214, 1302.
- 69) S.A. BARKER, J.F. KENNEDY et A. ROSEVEAR, J. Chem. Soc. (c), 1971, 2726.
- 70) N. FORNSTEDT, L. SONDBERG, G. EKLUND, R. AXEN et J.O. PORATH, Brevet Allemand n° 2 102 514, 29 juillet 1971 ; Chem. Abstr., 1971, 75, 105 551 g.
- 71) KOCH-LIGHT Sochibo, Enzacryl, Catalogue 1971.
- 72) T. WAGNER, C.J. HSU et G. KELLEHER, Biochem. J., 1968, 108 (5), 892.
- 73) R. AXEN, P. VRETBLAD et J.O. PORATH, Brevet Allemand n° 2 061 009, 24 juin 1971 ; Chem. Abstr., 1971, 75, 95 017 w.

- 74) R. EPTON, J.V. Mac LAREN et T.H. THOMAS, Biochem. J., 1971, 123 (4), 21 P.
- 75) P.S. FORGIONE, Brevet Allemand n° 2 104 810, 19 août 1971 ; Chem. Abstr., 1972, 76, II 590 n.
- 76) G. MANECKE, Biochem. J., 1968, 107, 2 P.
- 77) A.S. LINDSEY, Revs. Macromol. Chem., 1969, C 3 (I), I.
- 78) G.H. J. MELROSE, Rev. Pure Appl. Chem., 1971, 21, 83.
- 79) J. DOBO et G. KARPATY, Hung. Teljes, 321, 22 avril 1970 ; Chem. Abstr., 1971, 74, 28 316 j.
- 80) W.L. STANLEY, Brevet U.S. n° 3 672 955, 27 juin 1972 ; Chem. Abstr., 1972, 77, 99 669 z.
- 81) A.L. SHRIER, Biotechnol. Bioeng. Symp., 1972, n° 3, 323.
- 82) R.A. MESSING et H.H. WEETALL, Brevet Allemand n° 2 036 499, 3 février 1972 ; Chem. Abstr., 1972, 76, 123 536 f.
- 83) S. BLUMBERG, E. KATCHALSKI, L. GOLDSTEIN et Y. LEVIN, Brevet U.S. n° 3 627 640, 14 décembre 1971 ; Chem. Abstr., 1972, 76, 109 705 d.
- 84) L. FARRER et J.M. STURTEVANT, J. Biol. Chem., 1966, 241, 4825.

PROPRIETES DES
ENZYMES IMMOBILISEES

Afin de bien caractériser les dérivés insolubles préparés à partir d'enzymes solubles, il faut être en mesure de préciser les divers paramètres suivants : taux de fixation, activité enzymatique résiduelle, spécificité vis-à-vis du substrat, influence des inhibiteurs, constante de Michaelis-Menten, pH d'activité maximale et résistance à la dénaturation. Avec ces données, il est possible de se rendre compte des avantages et des inconvénients procurés par l'immobilisation d'une enzyme sur tel ou tel support. Nous allons, dans ce qui suit, décrire brièvement les diverses propriétés qui montrent tout l'intérêt que présente l'insolubilisation des enzymes.

I - TAUX DE FIXATION

Le taux de fixation d'une enzyme sur un support doit être donné en rapport de masses, par exemple en microgrammes d'enzyme fixées par milligramme de support (1).

Une manière simple de connaître la masse fixée consiste à déterminer la différence entre la masse d'enzyme mise en jeu et la masse d'enzyme restée en solution. Pour ce faire, on peut soit mesurer l'activité de l'enzyme en solution avant et après la fixation (2), soit doser par colorimétrie la quantité de protéines restant en solution (3). Pour être exacte, la première méthode nécessite que le support ne modifie pas l'enzyme non fixée, afin que cette dernière conserve son activité initiale. Avec la seconde méthode il ne doit pas y avoir en solution, en plus de l'enzyme, d'autre produit susceptible d'absorber en ultraviolet à la longueur d'onde choisie pour la mesure (280 nm pour la trypsine) (3).

On peut déterminer avec précision la masse de protéine fixée en réalisant une hydrolyse partielle de l'enzyme, puis en dosant soit un acide aminé libéré (par exemple la valine) (3), soit plusieurs acides aminés par l'intermédiaire d'un analyseur automatique (4). Une méthode particulière permet également de doser les groupes SH des enzymes qui en contiennent et ainsi de trouver directement la masse d'enzyme fixée sur un support (5). En général, on utilise au moins deux des méthodes précédentes pour s'assurer qu'elles donnent des résultats identiques.

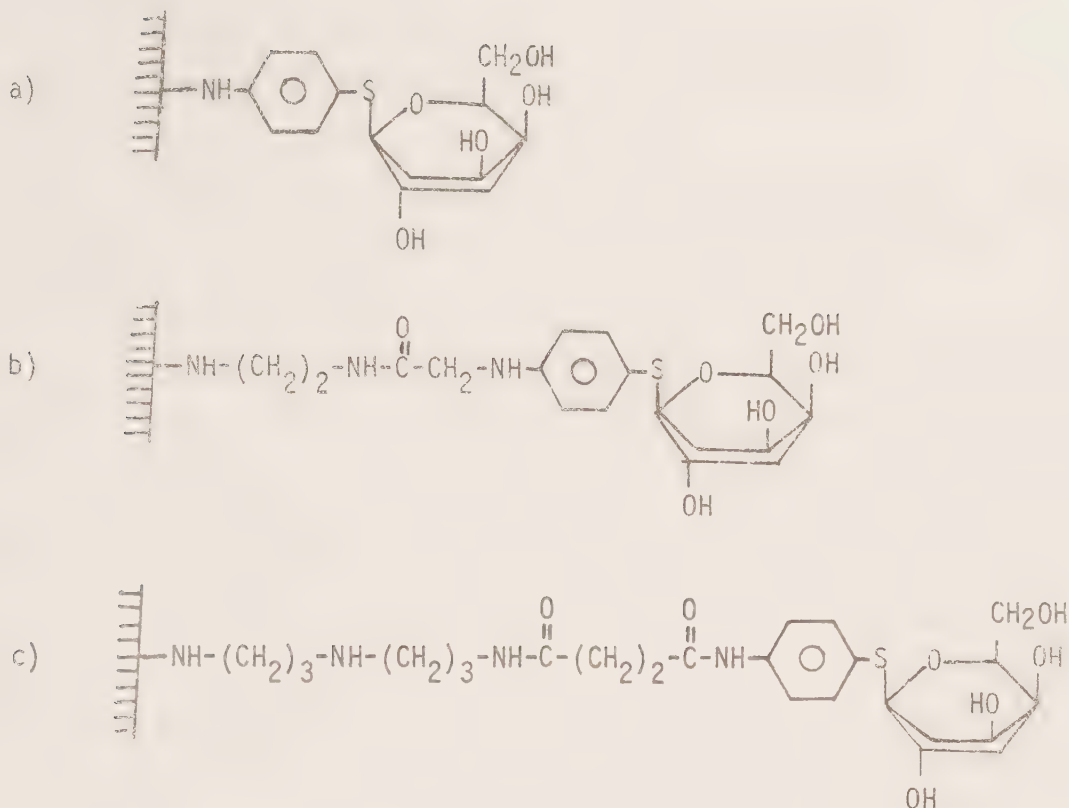
Les différents auteurs indiquent pour les enzymes des taux de fixation très variables (2 à 400 % de la masse du polymère), car ceux-ci dépendent de l'enzyme utilisée, du support choisi et de la méthode d'immobilisation employée.

Selon MANECKE (6), les protéines de grande masse moléculaire sont fixées moins facilement que les petites molécules, mais il y a des exceptions dues aussi bien à l'enzyme qu'au support :

Protéine	Masse moléculaire de la protéine	mg de protéine fixée sur 1 g de	
		copolymère acide méthacrylique-fluoro-3 nitro-styrène	copolymère acide méthacrylique-m isothiocyanatostyrène
salmine	1000 - 5000	650	2520
myoglobine	16900	615	150
lactalbumine	17900	510	335
papaïne	22000	1460	2380

Le taux de fixation n'est pas le même pour les deux polymères. Dans le cas de la papaïne, la fixation importante serait due aux structures enzymatiques secondaire et tertiaire différentes, ou au fort pourcentage de tyrosine contenue dans l'enzyme (6).

La fixation est plus importante sur une chaîne latérale que sur la chaîne principale d'un polymère et de plus le taux de fixation augmente en même temps que la longueur de la chaîne latérale (7). Ainsi dans le cas d'un inhibiteur d'une nucléase liée à l'agarose, si le couplage est direct (a) la capacité de fixation de la nucléase, en chromatographie d'affinité, est de 2 mg/ml de gel ; avec l'introduction de la N'-acétyléthylènediamine (b) comme chaîne latérale, la masse fixée est de 8 mg ; et avec la N'-succinylbis(amino-propyl) amine (c) de 10 mg par ml de gel. Dans les trois cas, les colonnes ont la même quantité d'inhibiteur par ml de gel (7) :



On ne peut avoir en même temps, pour le dérivé, un taux de fixation élevé et une activité enzymatique résiduelle (A E R) importante. Si on veut un taux de fixation élevé, il faut un support ayant une grande surface active par unité de volume. Pour ce faire, on peut diminuer le diamètre des particules ou augmenter leur porosité, mais cela au détriment des propriétés mécaniques. Ainsi, avec des grains de moins de 0,1 mm de diamètre, la masse d'enzyme fixée est trois fois plus importante qu'avec des grains de 0,1 à 0,2 mm (6). Pour une même masse de support, la fixation sera meilleure avec un polymère réticulé qu'avec des perles qui offrent une surface de contact bien moindre (6) :

Copolymère acide méthacrylique-fluoro-2 nitro-styrène (2/1)	Papaïne fixée	
	mg/g de résine	A E R
perles	1490	32
polymère réticulé	3260	36

Mais si le taux de réticulation est trop important, la fixation de la protéine est empêchée et le support présente moins d'aptitude au gonflement (6).

Un fort pourcentage de groupes hydrophiles permet d'augmenter le taux de protéines fixées mais, au-delà d'une certaine valeur, il peut entraîner une diminution du taux de fixation (6).

Un bon support (8) doit être complètement insoluble, d'une grande résistance biochimique et chimique, incompressible, hydrophile, suffisamment perméable pour permettre l'approche des groupes réactifs par l'enzyme ; il doit être susceptible d'une utilisation en colonne, susceptible de transformation en une forme réactive (activation possible) et dépourvu de centres adsorbants. Le support idéal, remplissant toutes ces conditions, semble impossible à trouver. Un compromis doit être envisagé. Actuellement, l'agar paraît le plus satisfaisant (8) parmi tous les types déjà utilisés : particules biologiques (érythrocytes), protéines et polyacides aminés, polysaccharides (cellulose, Séphadex, agarose, ...), polymères synthétiques (acrylamides, uréthanes, ...) et supports inorganiques (SiO_2 , verre, ...).

II - ACTIVITE

En général, l'immobilisation d'une enzyme sur un support insoluble entraîne une diminution de l'activité enzymatique (9 et 10). Cette perte d'activité est fonction de l'enzyme, du support et du substrat utilisés, ainsi que de la méthode d'immobilisation mise en oeuvre.

1. Perte d'activité

a) Influence de l'enzyme

La chymotrypsine, la trypsine et l'amylose immobilisées par liaison covalente avec le p-isothiocyanato-phénoxy-hydroxypropyl Séphadex G 200 ne présentent que 14 à 25 %, 17 à 24 % et 0 % respectivement de l'activité de l'enzyme libre (11). Après réaction avec le fluoro-4 nitrostyrène, la diastase ne présente plus que 3 % de son activité initiale, alors que la papaïne insolubilisée dans les mêmes conditions conserve 40 % de son activité originelle (12 et 13). Les centres actifs des enzymes sont plus ou moins dénaturés par la fixation.

b) Influence du support

D'autre part, après réaction avec un copolymère d'acide méthacrylique et de fluoro-4 nitrostyrène, la papaïne ne présente plus que 45 % de

son activité initiale (13), alors qu'après réaction avec un copolymère d'acide acrylique et de m-isothiocyanatostyrène, son activité originelle est entièrement conservée (14). De même la trypsine liée à la CM - cellulose (par des groupements azotures d'acyle) (15) conserve 20 % de son activité, l'A E R tombant à 5 % lorsqu'elle est couplée à un copolymère de L-leucine et de p-amino-DL-phénylalanine (par des groupements diazoïques) (3).

Afin d'avoir une activité enzymatique résiduelle (A E R) plus importante, il est souvent utile de traiter l'enzyme par un inhibiteur compétitif avant d'effectuer la fixation. De ce fait les sites actifs peuvent être protégés et mis à l'abri d'une forte dénaturation. Ainsi le chlorure mercurique réagit avec les groupes SH de la papaïne pour donner une mercuripapaïne qui, après fixation sur un polymère dérivé de l'amidon puis activation, conserve 60 % de son activité ; la papaïne cristallisée fixée sur le même support ne présente plus que 20 à 30 % de son activité originelle (4). De même le p-chloro-mercuribenzoate de sodium protège les groupes SH de l'uréase, ce qui permet de conserver les dérivés insolubles inhibés beaucoup plus longtemps que les dérivés à groupes SH libres (16).

Le caractère hydrophile plus ou moins grand du support peut également faire varier d'une manière importante l'A E R d'une enzyme immobilisée. Ainsi, lors de la fixation de diverses enzymes sur des copolymères anhydride maléique-éthylène (E M A), il est possible d'obtenir l'A E R maximale pour chaque enzyme en modulant le pourcentage de groupes anhydrides du copolymère (17) : la meilleure insolubilisation semble se faire lorsqu'il y a de 50 à 70 % de fonctions anhydrides. De plus, la trypsine liée à l'E M A retient 40 à 70 % de son activité initiale (18), mais, si on remplace dans ce copolymère l'éthylène par le butanedioldivinyléther plus hydrophile, l'A E R passe à 90 % (19). De même, le m-isothiocyanatostyrène copolymérisé avec de l'acide méthacrylique ou de l'acide acrylique ne donne pas la même A E R pour la papaïne fixée ; dans le premier cas, l'activité varie entre 48 et 102 % selon le pourcentage d'acide utilisé, alors que dans le second cas l'A E R est de 136 à 172 % (6) : le groupe méthyle hydrophobe entraîne donc une forte diminution d'activité.

Le contact entre l'enzyme liée et le substrat ne doit pas être gêné stériquement ; aussi il est nécessaire d'éviter la formation d'un trop grand nombre de liaisons entre la protéine et le support (20). Quand le taux de réticulation du support est trop faible, il se produit de nombreuses interactions entre celui-ci et l'enzyme, ce qui limite l'activité de cette dernière (21). La composition chimique du support, sa structure lorsqu'il est tridimensionnel (grandeur des pores), le mode de distribution de l'enzyme à l'intérieur et

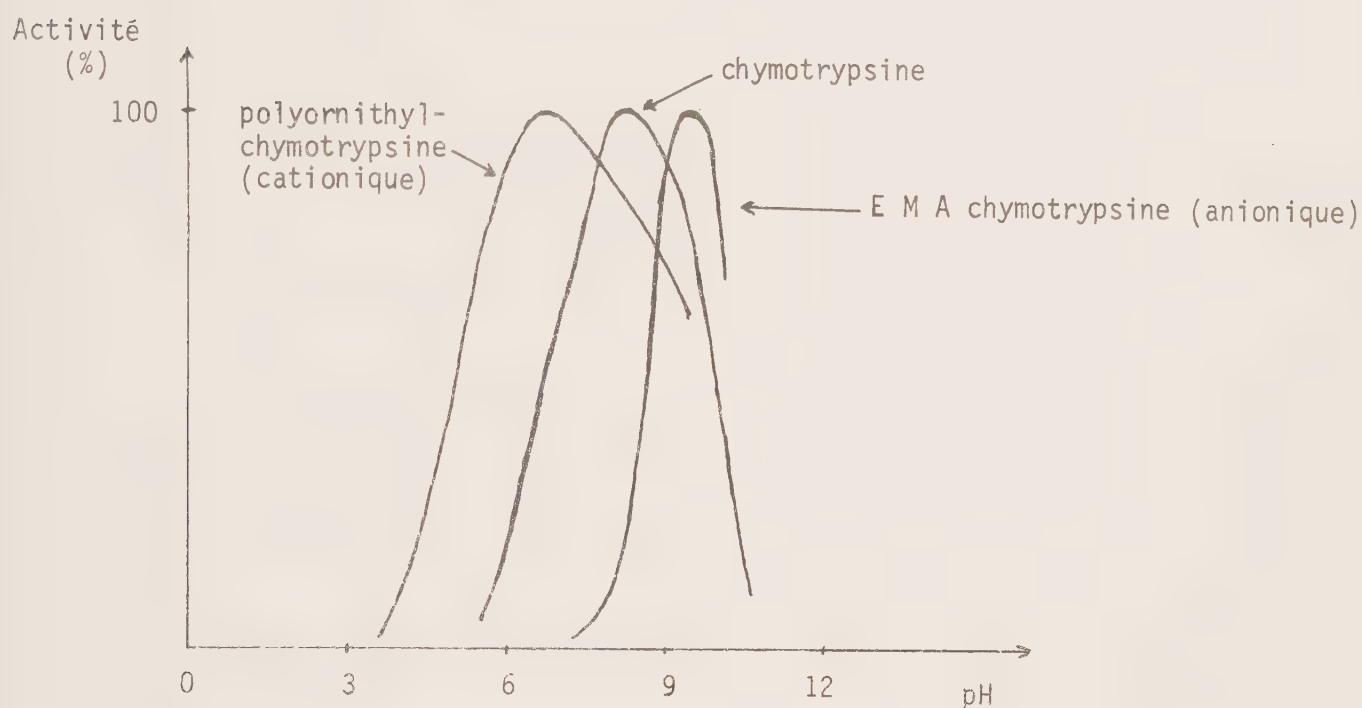
autour du polymère, jouent un rôle important pour l'A E R du dérivé (22). Aussi, pour une enzyme donnée, on doit choisir la technique d'insolubilisation et le support en fonction de la réaction biochimique désirée (23).

c) Influence du substrat

Une comparaison entre l'activité d'une enzyme libre et celle de son dérivé insoluble montre qu'en général la perte d'activité due à l'immobilisation est très importante quand l'enzyme transforme des substrats de grande masse moléculaire. En moyenne, l'A E R est de 40 à 80 % pour les substrats de petite masse (24), mais seulement de 5 à 40 % pour ceux de grande masse (25 et 26). Le fait que l'enzyme est probablement liée au support en plusieurs points et que celui-ci est souvent réticulé entraîne une diffusion du substrat dans le réseau d'autant plus difficile que la masse moléculaire de ce substrat est plus élevée. CRESSWELL et SANDERSON (27) ont étudié cet effet pour une protéinase immobilisée sur un copolymère diazoté de leucine et de p-aminophénylalanine. Ils ont mis en évidence une relation linéaire entre l'A E R du dérivé et le logarithme de la masse moléculaire du substrat : l'activité protéolytique décroît quand la masse augmente et, à l'extrême, seules les molécules d'enzyme fixées à la surface des particules poreuses restent actives.

Quand le support et le substrat sont électriquement neutres, seuls les effets stériques ont une influence sur l'A E R des dérivés étudiés. Avec des supports ionisés il se produit en outre des interactions électrostatiques entre le support et les substrats chargés. Si le support et le substrat portent des charges opposées, la concentration en substrat est plus forte à la surface et à l'intérieur du dérivé que dans le reste de la solution. Inversement, si le support et le substrat portent des charges de même signe, la répulsion électrostatique entraîne une diminution de la concentration en substrat dans le microenvironnement de l'enzyme liée. La diminution de concentration en substrat (répulsion) à proximité du dérivé entraîne pour l'enzyme une affinité apparente moins grande vis-à-vis de son substrat (28 et 29). L'augmentation de la concentration en substrat (due à une attraction) dans le microenvironnement de l'enzyme liée augmente au contraire l'A E R du dérivé considéré. Ces phénomènes sont mis en évidence lors de l'activation des chymotrypsinogènes A et B par la trypsine fixée sur un support polyanionique (CM-cellulose) (19). Les deux proenzymes ont la même masse moléculaire (25000) mais des charges électriques opposées à pH voisin de 7 (points isoélectriques à pH 9,5 et 5,2 respectivement). Dans les mêmes conditions opératoires ($\text{pH} \simeq 7$), il faut sept fois plus de trypsine immobilisée pour activer le chymotrypsinogène B porteur de charges négatives que pour le chymotrypsinogène A porteur de charges positives.

Il est intéressant d'étudier les courbes d'activité en fonction du pH, des dérivés polyanioniques de diverses enzymes protéolytiques transformant des substrats de bas poids moléculaire. En milieu de faible force ionique ($I/2 \approx 0,01$ mole/l), on note un déplacement "alcalin" de 1 à 2,5 unités de pH par rapport aux courbes d'activité des enzymes libres (28 et 30). Les dérivés polycationiques des mêmes enzymes produisent l'effet contraire, c'est-à-dire un déplacement vers les pH acides (28). L'exemple suivant de la chymotrypsine illustre bien ce qui précède :



Ces anomalies disparaissent dans des milieux de force ionique élevée ($I/2 \geq 1$ mole/l).

De même Mc LAREN (31 et 32) indique que, sur des supports porteurs de charges négatives, la concentration en protons est importante : elle produit un "pH superficiel" de 1 à 2 unités de pH inférieur à celui de la phase externe. Dans la plupart des réactions enzymatiques il se produit une distribution inégale des ions entre le support chargé, la molécule d'enzyme (poly-électrolyte) et la solution (30).

L'interaction électrostatique entre le support et un substrat porteur de charges opposées peut être un avantage. Si la concentration en substrat décroît au cours d'une réaction enzymatique, la vitesse de réaction de l'enzyme immobilisée diminuera moins vite que celle de l'enzyme libre (33).

Le phénomène de diffusion influence également la concentration en substrat dans le microenvironnement de l'enzyme immobilisée. Il peut diminuer l'A E R des dérivés. Ainsi les enzymes insolubles atteignent leur activité maximale pour des vitesses d'agitation importantes (34 à 36). L'influence de la diffusion sur l'activité de l'enzyme liée dépend de la vitesse maximum de réaction de l'enzyme libre, du coefficient de diffusion du substrat et de l'épaisseur du film de diffusion (29). Pour deux substrats de masses sensiblement voisines (même encombrement stérique), les résultats peuvent être fort différents. C'est le cas de la trypsine fixée sur un gel de polyhydroxy-éthylméthacrylate : avec la benzoyl-L-arginineéthylester (B A E E) l'activité est la même pour le gel et l'enzyme libre, alors qu'avec l'ester méthylque de la p-toluènesulfonyl-L-arginine (T A M E), le gel se montre sept fois moins actif que l'enzyme de départ (37). Cette forte variation ne peut s'expliquer par la faible différence de masse entre le B A E E et le T A M E.

d) Influence du mode d'immobilisation

Le type d'immobilisation utilisé est très important ; il peut provoquer, pour une même enzyme, des dénaturations très variables (23 et 38). Ainsi la chymotrypsine physisorbée sur la CM-cellulose conserve 85 à 99 % de son activité initiale (39) alors que la même enzyme liée au même support par liaison covalente ne présente plus qu'une A E R de 10 à 55 % (40).

De plus, pour une même enzyme, un même support et un même type d'immobilisation, l'A E R du dérivé obtenu diminue quand on augmente le pH, la température ou le temps de fixation (41). En général, pour conserver une bonne A E R, la fixation doit se faire le plus près possible de 0°C, pendant des temps n'excédant pas 24 heures, à un pH voisin du point isoélectrique de l'enzyme utilisée et dans des solutions aqueuses de faible force ionique (20).

L'enzyme est généralement liée au support par ses groupements NH_2 . La valeur du pK_B des groupes NH_2 terminaux des peptides est inférieure à celle des groupes NH_2 des résidus lysines en chaîne latérale. En faisant varier le pH on peut favoriser la fixation par les NH_2 en bout de chaîne, d'autant plus qu'ils ne sont pas dans des sites stériquement encombrés. Mais si le nombre de liaisons avec le support est trop important, il y a altération des propriétés de la protéine fixée. Ainsi l'immuno-globuline fixée à pH 9 sur l'agarose activé retient 7 % de la quantité théorique d'insuline contre 77 % quand la globuline est fixée à pH 6,5 (42).

Lors de la fixation de l'enzyme une variation du pH peut entraîner

soit une A E R du dérivé maximale, soit un taux de fixation important (43).

2. Augmentation d'activité

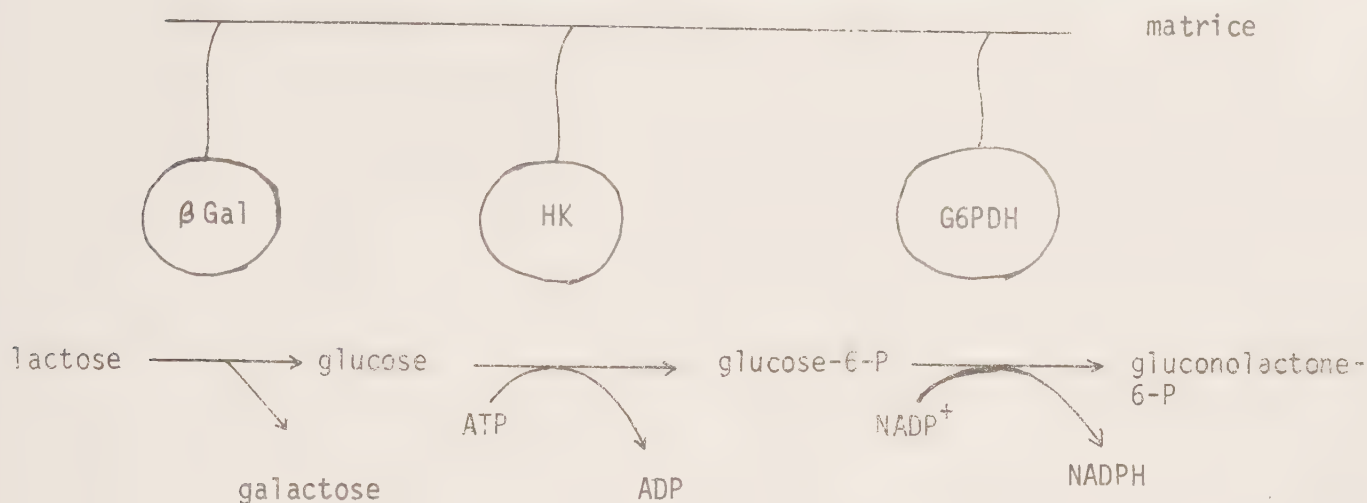
De nombreux cas d'augmentation d'activité sont décrits. Certains dérivés de la trypsine se montrent plus actifs vis-à-vis du B A E E que l'enzyme libre (44). De même le collagène peut être digéré plus vite par une papaïne immobilisée que par la papaïne native (45). Une papaïne insolubilisée conserve son activité originelle aussi bien avec les substrats de grande masse qu'avec ceux de faible masse moléculaire (46). L' α -amylase liée à un polystyrène activé libère plus de glucose par unité de temps que l'enzyme de départ (47). La papaïne fixée sur un copolymère acide méthacrylique-m-isothiocyanatostyrène (2/1) présente une A E R de 102 % alors qu'avec un copolymère 2/1 de l'acide acrylique, l'A E R atteint 155 % de l'activité originelle (6). De plus, en augmentant le pourcentage de groupements acryliques hydrophiles (copolymère 4/1), l'A E R passe de 155 à 172 % sans qu'une explication valable puisse être proposée (6). Ces augmentations d'activité pourraient être dues à un changement de conformation de la chaîne polypeptidique de l'enzyme (15 et 35), à une interaction entre le support et l'enzyme (18,30 et 48) ou à une modification du site actif (15 et 49).

Le Dextran augmente l'activité de l' α -amylase (50). L'augmentation plus importante pour le Dextran 2000 que pour le D 50 et le D 20, semble proportionnelle à la masse du polysaccharide. Dans les mêmes conditions opératoires, l'activité de la phosphatase alcaline ne change pas. Ceci semble indiquer que le phénomène est limité aux enzymes dont les réactions de catalyse se font sur des substrats de grande masse moléculaire, ou des substrats formant plusieurs points d'attache avec l'enzyme (50).

L'introduction de certains groupements fonctionnels peut augmenter l'activité de l'enzyme de départ. Ainsi la ribonucléase A traitée par le diméthyladipimide voit son activité enzymatique passer de 100 à 160 % (51). La phénylazobenzoyl Takaamylase transforme 2,5 fois plus d' α -phénylmalto-side que l'enzyme native (52). L'introduction de groupes SH dans la Takaamylase multiplie l'activité par 1,8 (53). L'augmentation d'activité, provoquée par la fixation d'une enzyme sur un support hydrophile, est peut être due à une "activation" du même type que celles ci-dessus.

La faible diffusion d'un métabolite dans le microenvironnement d'une enzyme immobilisée entraîne une accumulation du produit ; ceci peut avoir un effet particulier. Ainsi trois enzymes différentes (β galactosidase, hexokinase, glucose-6-phosphate déshydrogénase) peuvent être fixées sur du Séphadex activé au BrCN (54). Ces trois enzymes catalysent, en trois étapes

successives, la transformation du lactose en gluconolactone-6-P selon le schéma suivant :



La vitesse de réaction dépend de la concentration en produits intermédiaires. Ce système "multienzymatique" se montre plus efficace que les trois enzymes libres en solution car le glucose formé primitivement ne diffuse pas immédiatement en dehors du dérivé : il reste en forte concentration près de l'hexokinase, facilitant ainsi la seconde étape. Il en est de même pour le glucose-6-P formé ultérieurement (54).

3. Propriétés nouvelles

Le dérivé insoluble peut avoir des propriétés enzymatiques très différentes de celles de l'enzyme libre. Ainsi la trypsine native hydrolyse les quinze liaisons lysyles de la chaîne polypeptidique du pepsinogène alors que son dérivé insoluble n'en coupe que dix (44). L'A T Pase insoluble, contrairement à l'enzyme soluble, est inhibée par l'ouabaïne mais reste insensible à une activation par KCl et NaCl (55). La ficine immobilisée n'est pas activée par la cystéine (35). La polytyrosyltrypsine et l'EMA-trypsine insolubles attaquent la prothrombine. La première, comme la trypsine soluble, transforme la prothrombine en thrombine qui n'est pas digérée par la suite. Par contre la seconde dégrade rapidement la thrombine nouvellement formée (10 et 28).

Ces propriétés nouvelles semblent indiquer que la nature chimique du support, au moins dans le cas de dérivés ioniques, impose des restrictions à la spécificité des enzymes immobilisées. Ces restrictions résultent probablement d'interactions ioniques entre le support et différentes zones ou diverses séquences des substrats de grande masse moléculaire (10 et 28).

III - VITESSE DE REACTION

En général, on détermine les activités enzymatiques en mesurant la vitesse de réaction. La vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme immobilisée dépend des propriétés physiques et de la configuration géométrique du dérivé qui est un catalyseur hétérogène (56). La vitesse ne sera pas la même si l'enzyme est liée à un support sous forme de grains (6 et 39), de morceaux de papier filtre (57) ou de membranes (58 et 59). De plus la force ionique de la solution et la charge électrique du support ou du substrat sont des facteurs influençant le cours des réactions enzymatiques (29,35 et 57).

IV - CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN

D'une manière simplifiée, en appelant E l'enzyme, S le substrat, ES un complexe intermédiaire unique et P le produit final, une réaction enzymatique peut être représentée par :



Si on suppose que ES est le seul produit intermédiaire formé,

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0$$

On pose :

$$\frac{[E] [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \text{ constante de Michaelis}$$

K_m est la constante de dissociation apparente du complexe. Plus K_m est faible, plus l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat est élevée et inversement. Si le K_m d'une enzyme augmente lors de la fixation l'activité enzymatique du dérivé est plus faible que celle de l'enzyme native ($A E R < 100 \%$).

En général le K_m d'un dérivé insoluble est supérieur à celui de l'enzyme libre (60 et 61) ; il peut être identique (30) ou inférieur (35 et 57).

Il dépend des mêmes facteurs que la vitesse de réaction mais, en plus, il est fonction de la vitesse d'agitation du mélange réactionnel (35 et 62), ou de la vitesse d'écoulement dans les colonnes utilisées en percolation continue (3 et 57).

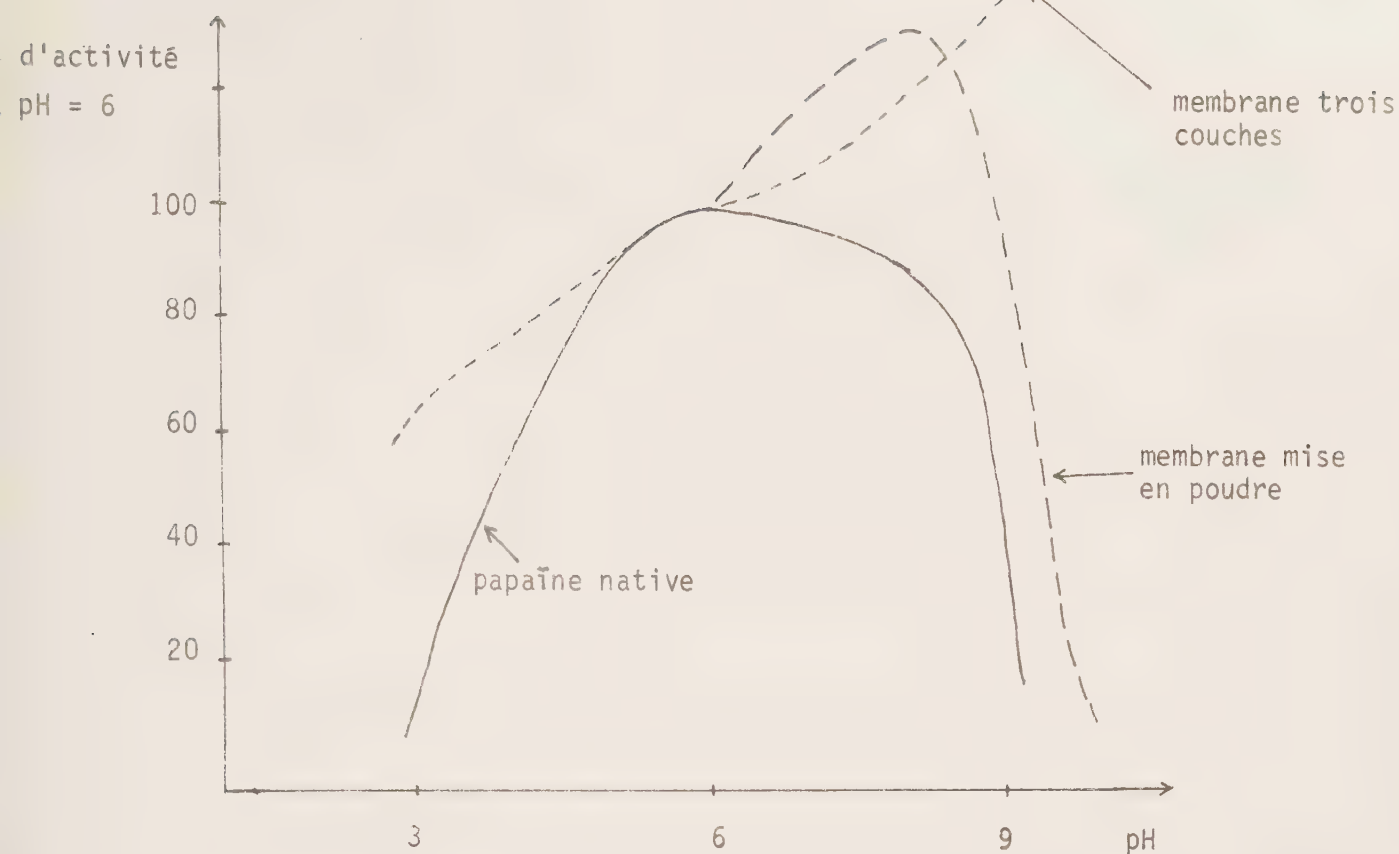
Il faut être très prudent dans ses conclusions. Ainsi un dérivé polyanionique de la trypsine (EMA-trypsine) transformant un substrat chargé positivement (benzoyl-L-arginine ou B A A) semble avoir, à faible force ionique, un K_m nettement inférieur à celui de l'enzyme libre (30 fois moindre) (30). Le même phénomène a été mis en évidence avec des dérivés polyanioniques (CM-cellulose) de ficine (35) et de bromélaïne (63) en prenant le B A E E comme substrat. Mais dans des solutions de grande force ionique, la perturbation est supprimée (30 et 63) : les valeurs du K_m sont identiques pour l'enzyme libre et son dérivé insoluble. Le K_m est le même que celui de l'enzyme soluble quand on transforme des substrats électriquement neutres avec des dérivés polyanioniques ou polycationiques de chymotrypsine et un dérivé polyanionique de papaïne. Les perturbations observées semblent dues à la distribution inégale des charges ioniques entre le support, l'enzyme et la solution (30). Le K_m augmente quand la diffusion du substrat dans le dérivé est difficile : par exemple si le dérivé et le substrat portent des charges de même signe ou si le substrat subit des contraintes stériques (10 et 28).

V - ACTIVITE EN FONCTION DU pH

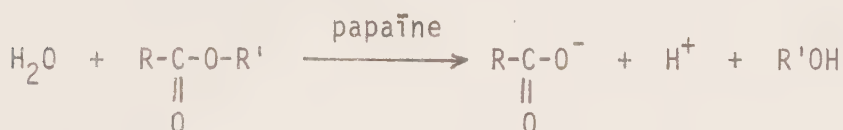
Quand le pH du microenvironnement de l'enzyme immobilisée est différent de celui du reste de la solution, les courbes d'activité du dérivé en fonction du pH peuvent être déplacées de 1 à 2 unités vers les pH alcalins. C'est le cas de la trypsine (30) et de la chymotrypsine (10) fixées sur l'E M A, de la chymotrypsine (64) et l'apyrase (65) liées à l'acide polyacrylique, de la CM-cellulose-ficine (35).

Les courbes d'activité en fonction du pH sont en général identiques pour l'enzyme libre et son dérivé insoluble. C'est le cas de la peroxydase liée à la CM-cellulose (66), la polytyrosyltrypsine (3), la trypsine réticulée par le glutaraldéhyde (49) et la glucose oxydase immobilisée sur une membrane de collodion (58).

Des variations importantes sont notées dans le cas de la papaïne immobilisée sur membrane (45 et 67). Elles dépendent du substrat (amide ou ester) et sont plus ou moins prononcées. Avec le B A E E, les courbes sont les suivantes :

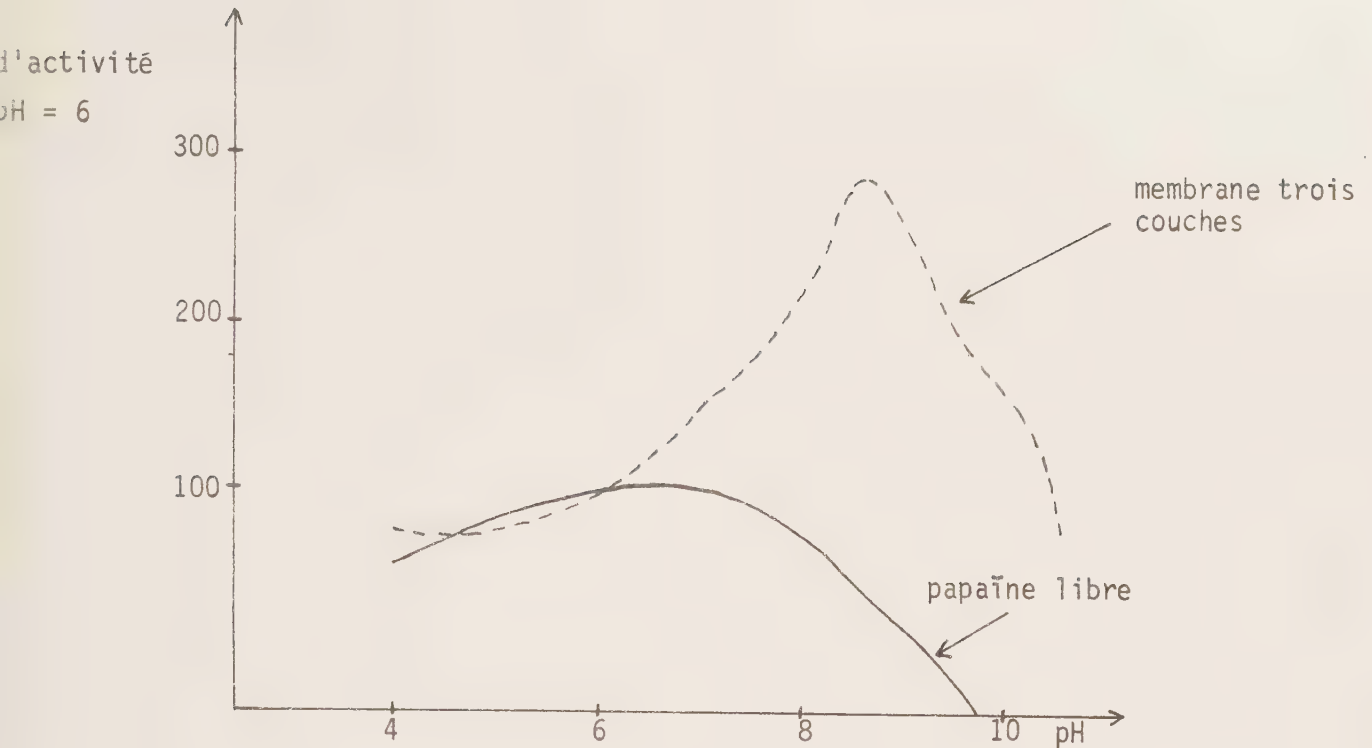


La réaction d'hydrolyse du B A E E peut s'écrire :



Les protons libérés diminuent le pH à proximité de la membrane et provoquent une complète distorsion de la courbe pour des valeurs de $\text{pH} > 6$ dans la solution externe. En dessous de pH 6, les concentrations en protons sont sensiblement les mêmes dans le microenvironnement de l'enzyme et dans la solution. A $\text{pH} < 4$, le pH "extérieur" est inférieur à celui au voisinage du site actif de l'enzyme et les courbes sont de nouveau différentes.

Le benzoylglycineéthylester (B G E E) est nettement moins vite hydrolysé par la papaïne que le B A E E. Pour un même temps de réaction la quantité de protons libérés est donc moindre. A chaque stade de la réaction, les valeurs du pH du microenvironnement de l'enzyme liée sont plus grandes avec le B G E E qu'avec le B A E E. Les courbes d'activité en fonction du pH, pour l'enzyme libre et son dérivé, différent nettement (B G E E comme substrat) (45 et 67) :



La transformation de la benzoyl-L-arginine amide (B A A) libère des ions NH_4^+ . Pour des valeurs du pH comprises entre 4,5 et 8 l'enzyme libre et son dérivé insoluble présentent des courbes d'activité semblables car le pH du microenvironnement et celui de la solution sont sensiblement identiques. A pH plus alcalin, les ions NH_4^+ se transforment en NH_3 et H^+ . Le pH de la membrane devient inférieur à celui de la solution et les courbes d'activité enzymatique représentatives de l'enzyme libre et du dérivé divergent (45 et 67). La cholinestérase liée à l'agarose conduit à des résultats identiques et les distorsions observées reçoivent la même explication (68).

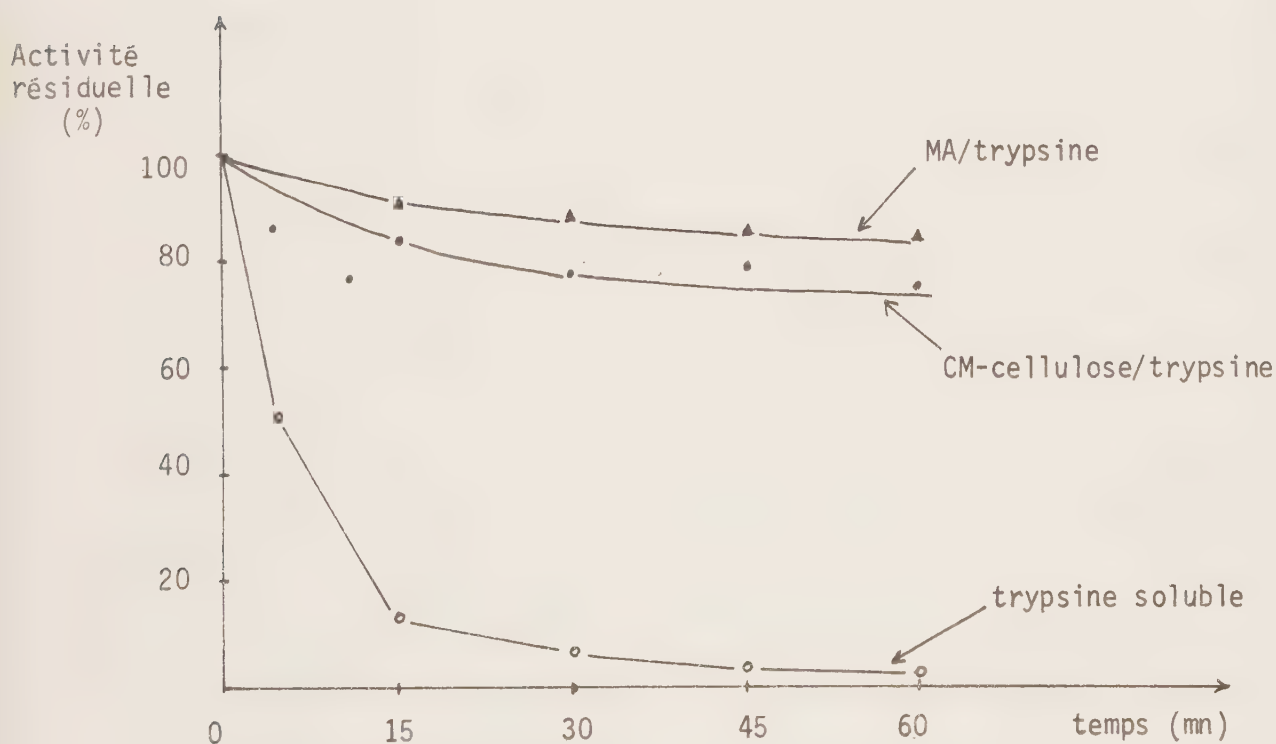
VI - RESISTANCE A LA DENATURATION

L'enzyme immobilisée par liaison covalente se détache parfois de son support. Diverses enzymes liées à l'agarose ou l'AE-cellulose passent peu à peu en solution lors de la conservation des dérivés en suspension (69). La masse d'enzyme ainsi libérée et présente dans les filtrats est fonction du support et de la concentration en protons dans la solution de stockage (69). Mais, en général, l'enzyme liée reste fixée au support même à des pH extrêmes. Ainsi, après agitation pendant une heure dans divers tampons acétates (pH de 4 à 9) d'une peroxydase liée à de la CM-cellulose, on n'observe aucune activité dans les filtrats (66). De même la trypsine liée au copolymère éthylène-anhydride maléique reste entièrement fixée sur son support quand le dérivé est conservé plusieurs mois dans une solution de NaCl (pH 7)

à 4° (30).

Dans leur grande majorité, les dérivés insolubles résistent mieux aux pH extrêmes que l'enzyme libre. Ceci est vraisemblablement dû au fait que le pH du microenvironnement de l'enzyme liée diffère de celui de la solution. Ainsi après 25 heures d'incubation à pH 9 et 25°, la polytyrosyl-trypsine perd seulement 20 % de son activité alors que l'enzyme soluble est totalement désactivée dans les mêmes conditions (3). La papaïne fixée sur collodion, et maintenue à pH 2,2, conserve 50 % d'activité alors que dans les mêmes conditions l'enzyme libre n'a plus que 10 % de son activité originelle (67).

Aux températures élevées les dérivés insolubles résistent également mieux que l'enzyme libre. La trypsine, liée à la CM-cellulose ou à un copolymère bis(vinyloxy-1,4) butane-anhydride maléique (MA), est beaucoup plus stable à 55° que l'enzyme native (19) :



Il semble que la fixation d'une enzyme sur un support protège la conformation de la protéine contre les effets de dénaturation (20). La grande stabilité des dérivés trypsine/copolymère acrylamide-acrylate de méthyle est attribuée à une impossibilité d'autodigestion et de dénaturation thermique résultant de la fixation des molécules d'enzyme sur des sites du copolymère mutuellement éloignés (70). Si la stabilité thermique d'un dérivé

insoluble est inférieure à celle de l'enzyme soluble et si on veut augmenter cette stabilité, il est parfois suffisant de faire subir à l'enzyme un traitement convenable avant la fixation (71).

Les enzymes immobilisées se conservent mieux à l'état sec qu'en suspension aqueuse. L'eau est éliminée par séchage sous vide ou mieux par lyophilisation. Ainsi, après lyophilisation, l'activité enzymatique est totalement conservée pour la ficine (35) et la chymotrypsine (48) liées à la CM-cellulose, pour la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine adsorbées sur des celluloses échangeuses d'ions (39), pour la glucose oxydase et une déshydrogénase occluses dans un gel de polyacrylamide (56). Le séchage sous vide et la lyophilisation peuvent altérer l'enzyme immobilisée. Ainsi la papaïne fixée sur une résine diazotée (4) peut être conservée six mois en suspension aqueuse sans perdre de son activité alors que le même dérivé lyophilisé a au départ une A E R de 30 % et le dérivé séché sous vide une A E R de 50 à 60 %. Ces mêmes dérivés, conservés à l'état sec, gardent une activité constante pendant les six premiers mois. L'enzyme fixée est donc dénaturée au moment de la lyophilisation ou du séchage sous vide (4). La subtilopectidase fixée sur la même résine diazotée peut être conservée trois mois en suspension aqueuse sans perdre de son activité alors que la lyophilisation et le séchage sous vide désactivent totalement le dérivé (4).

Certains dérivés peuvent être conservés longtemps en suspension dans l'eau ou des solutions tampons de divers pH. L'enzyme libre mise en solution est généralement détruite en quelques jours (parfois quelques heures), mais la ficine liée à la CM-cellulose, maintenue dans l'eau à pH 5 et 2°, perd seulement 15 % de son activité en 4 mois (35) ; la papaïne, fixée sur un copolymère de leucine et de p-aminophénylalanine (36) et conservée à pH 6 et 4°, garde 70 % de son activité après un mois de stockage et 25 % au bout de 9 mois ; la papaïne liée au collagène (36) perd 50 % de son activité au cours du premier mois de stockage en suspension mais seulement 70 % en deux ans ; la trypsine immobilisée sur le copolymère de leucine et de p-aminophénylalanine (3) perd 70 % de son activité en douze mois de stockage dans HCl 0,0025 N à 4°. Ces pertes d'activité au cours du temps sont vraisemblablement dues au fait qu'en suspension aqueuse l'enzyme fixée peut continuer à réagir avec les fonctions libres du support, que le dérivé est également soumis à la contamination microbienne et au vieillissement du support (23).

La résistance des dérivés insolubles à la dénaturation dépend du support utilisé, du système de fixation mis en oeuvre et de l'enzyme immobilisée (23). Le caractère hydrophile du support augmente la stabilité des dérivés (70). Si l'enzyme liée est conservée en présence d'inhibiteur, la

perte d'activité est très faible (67). Il semble d'autre part que l'uréase fixée sur divers supports ne présente pas le même mécanisme de dénaturation que l'enzyme soluble (16).

La grande stabilité des enzymes immobilisées permet de les utiliser plusieurs fois de suite pour catalyser les réactions des plus diverses (10 et 72). Après utilisation, les dérivés insolubles sont récupérés par filtration ou centrifugation et peuvent servir à nouveau pour le même genre de réactions (10). Ils peuvent également être employés en continu dans des colonnes thermostatées avec percolation de substrat pendant plusieurs jours de suite (73 à 75).

VII - UTILISATION

Les enzymes immobilisées peuvent être utilisées en suspensions agitées ou en lit fixe dans une colonne avec percolation continue d'une solution de substrat. Dans ce dernier cas le dérivé est employé tel quel (56 et 73) ou en mélange homogène avec un support inerte comme une résine polyvinylique (3), de la célite (16), de la cellulose (74) ou du verre (75). Le produit final de la réaction est recueilli dans l'éluat. Pour une même quantité initiale de substrat et d'enzyme insoluble, la percolation en continu permet d'obtenir plus de produit transformé que la suspension agitée (10 et 76). Les colonnes d'enzymes insolubles sont de plus en plus utilisées car elles nécessitent peu de manipulations et restent actives très longtemps. Ainsi l'invertase, adsorbée sur brique pilée ou verre activés (77), peut être mise en oeuvre 46 jours en continu sans perdre de son activité initiale ; la trypsine liée à des tubes de nylon (par des groupements azotures d'acyle) conserve son activité au bout de 12 jours de percolation ininterrompue (78). On peut utiliser dans la colonne un seul type d'enzyme immobilisée (77 et 78) ou plusieurs enzymes différentes (79). Des colonnes peuvent fonctionner en série avec des enzymes différentes (80). Diverses relations entre la concentration en produit obtenu, la hauteur de la colonne, le temps d'incubation du substrat en présence de l'enzyme, la vitesse d'écoulement et la température peuvent être mises en évidence (3, 75 et 81). Ainsi on a trouvé une relation linéaire entre $P \left[\frac{S_0}{S_0 - S} \right]$ et $\log (I - P)$ pour une colonne de glucoamylase adsorbée sur charbon actif (82), P étant le pourcentage de substrat transformé et S_0 la concentration initiale en substrat.

Depuis 1965, date de la première utilisation d'une papaïne insolubilisée sur membrane (45), de nombreuses enzymes ont été insolubilisées de cette manière, par exemple la glucose oxydase (58). La membrane peut être plus ou

moins complexe. C'est le cas de la papaïne adsorbée sur membrane de collodion puis réticulée par la bis(diacide sulfonique-2,2') diazobenzidine (67). On peut ainsi fabriquer une membrane à une couche d'enzyme (70 à 120 μ d'épaisseur), une membrane à deux couches ayant une partie papaïne ($\approx$ 120 μ) et une partie collodion (200 à 300 μ), et enfin une membrane à trois couches (300 à 500 μ) comprenant deux couches d'enzyme séparées par du collodion. Ces trois types de membranes ont des réactivités différentes qui sont fonctions de la vitesse de diffusion du substrat qui les traverse. La réaction de catalyse enzymatique dans la membrane exclut l'équilibre des concentrations en substrat et en produit formé entre la solution extérieure et la membrane elle-même (67). Il apparait des gradients de concentration locaux en produit et en substrat. La disparition du substrat transformé par l'enzyme est compensée par la diffusion du substrat venant de la solution ; de même le produit formé diffuse vers la solution où sa concentration est plus faible (67). Si on force (pression) le substrat à passer à travers la membrane, celle-ci peut être considérée comme une colonne très courte (3 et 35), car la quantité de substrat transformé est importante.

Des feuilles ou des disques de support poreux (papier filtre par exemple), sur lesquels l'enzyme est fixée, forment un lit d'activité enzymatique intéressant pour une utilisation en continu. On a ainsi immobilisé la peroxydase (83), la β galactosidase et la chymotrypsine (84).

Par l'intermédiaire du glutaraldéhyde, l'asparaginase est fixée sur un tube de nylon partiellement hydrolysé (85). Le substrat s'écoule à travers le tube où il est transformé. L'activité enzymatique varie en sens inverse du débit de solution.

Une membrane d'ultrafiltration laisse passer le substrat mais pas l'enzyme (86). Il n'est donc pas nécessaire de fixer l'enzyme ce qui évite sa dénaturation par formation de liaison avec le support. Le système peut être utilisé en continu mais l'enzyme restée libre se dénature néanmoins très vite car elle est en solution.

1. Applications en synthèse

Depuis peu des réacteurs industriels contenant des dérivés insolubles d'enzymes servent à catalyser des réactions in vitro. Ainsi l'invertase immobilisée permet la préparation de glucose pur soit par utilisations successives dans une cuve fermée, soit par percolation continue dans un réacteur à circulation de substrat (23). Avec des solutions de sucrose pur l'invertase adsorbée donne de bons résultats mais pour les sirops industriels il est nécessaire de

prendre une invertase immobilisée par liaison covalente (23). Un lit d'enzyme immobilisée de 5 x 13 cm permet d'obtenir 3,8 kg de glucose pur en 100 h (34).

La L-méthionine pure peut être séparée du racémique acétyl-DL-méthionine (87). La réaction est catalysée en colonne par l'aminoacylase adsorbée sur D E A E-cellulose ou D E A E-Séphadex. La colonne ne perd que 40 % de son activité après un mois d'utilisation continue. Cette perte peut être compensée par une addition d'enzyme qui s'adsorbe sur le polymère. On espère obtenir ainsi 20 tonnes de L-méthionine par mois (87).

L'acide amino-6 pénicillanique est le produit de départ de nombreuses pénicillines synthétiques. Il peut être obtenu par coupure de la benzylpénicilline à l'aide de la pénicilline-amidase fixée sur la D E A E-cellulose (88). Cette réaction avec enzyme immobilisée évite le procédé complexe de fermentation. Elle permet d'obtenir un produit pur dépourvu d'enzymes, d'impuretés ou de sous-produits susceptibles de provoquer des allergies lors des traitements thérapeutiques par la pénicilline (88).

Dans la synthèse des stéroïdes, l'emploi d'enzymes immobilisées est plus difficile car les enzymes transformant les stéroïdes sont instables. Toutefois des enzymes, occluses dans un gel de polyacrylamide, permettent d'obtenir l'hydrocortisone puis la prednisolone (89), alors que l'A E R du dérivé n'est égale qu'à 7 % de celle de l'enzyme libre.

L'acide polyribonucléique, très utilisé en pharmacologie, est difficile à isoler en réaction chimique. Par contre, la polynucléotide phosphorylase, fixée sur la cellulose (activée par Br CN), permet l'obtention de ce produit avec une grande pureté car l'enzyme immobilisée peut être retirée de la solution par simple centrifugation (90). De même la ribonucléase liée à la CM-cellulose permet de recueillir des trinucleotides purs obtenus jusqu'alors par des synthèses chimiques très difficiles (91).

2. Utilisation en analyse

Diverses électrodes à enzyme sont actuellement opérationnelles. HICKS et UPDIKE (56) utilisent la glucose oxydase occluse dans un gel de polyacrylamide pour doser le glucose en solution sans emploi de réactif. La méthode de dosage est basée sur la réaction :



La catalyse est suivie par mesure électrique de la disparition d'oxygène dans la solution. La glucose oxydase peut être placée sous forme de gel

dans une colonne où s'écoule le liquide étudié (92) ou liée à une membrane fixée à l'électrode immergée dans la solution (93). De même l'urée peut être dosée en solution d'après la réaction $\text{urée} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{uréase}} 2 \text{NH}_4^+ + \text{CO}_2$, à l'aide d'uréase contenue dans une membrane de gel de polyacrylamide fixée directement sur une électrode de verre sensible aux ions NH_4^+ (94). Le dosage de l'urée sanguine peut être ainsi réalisé in vivo.

La peroxydase liée à la CM-cellulose permet de mettre en évidence le peroxyde d'hydrogène (83), l'enzyme étant fixée sur une feuille de papier filtre. La solution à étudier est mise directement sur ce papier avec de la benzidine. Une coloration bleue tournant au brun indique un test positif.

La cholinestérase insoluble permet de détecter par fluorimétrie la présence d'insecticides ou herbicides en solution car ces produits sont en général des inhibiteurs d'enzymes (95). Ce système permet de prouver l'existence de la substance toxique mais pas de déterminer sa quantité.

3. Utilisations dans l'alimentation

Dans l'industrie alimentaire, les enzymes immobilisées peuvent être utilisées avec profit pour rendre le vin plus limpide, pour prolonger la conservation du lait (trypsine) et pour fabriquer les fromages (pepsine) et même la bière (96). Ainsi la papaïne liée à un copolymère E M A permet d'obtenir de la bière plus claire, plus stable et d'un meilleur goût (97). Le méthacrylate de β -hydroxyéthyle peut être polymérisé sous forme de films contenant diverses enzymes, et utilisé dans des aliments, des savons ou des détergents (98). L'amylase, la lipase et la dextranase, liées au copolymère E M A, permettent d'obtenir des gargarismes, des pâtes dentifrices et des chewing-gums contenant des combinaisons covalentes enzyme/support solubles ou insolubles (99). Des détergents contenant des enzymes liées au copolymère E M A peuvent rester quatre semaines en milieu aqueux sans perdre de leur activité enzymatique (100).

4. Utilisation en biochimie

En biochimie, le plus grand intérêt des enzymes immobilisées est la possibilité de les utiliser comme modèles des réactions cellulaires (10, 11, 48, 55, 62 et 67). Dans le corps humain, beaucoup d'enzymes sont liées à des membranes cellulaires (11 et 101) : le couplage entre une enzyme et une membrane de collodion peut alors servir de modèle. Les recherches sur les membranes artificielles contribuent à élucider le mécanisme du transport des métabolites à l'intérieur des cellules et entre les différentes cellules (67). Ainsi l'ATPase est immobilisée sur la CM-cellulose (55), bien que le polymère synthé-

tique altère plus la conformation de la protéine que ne le fait la paroi cellulaire, des études comparatives permettent d'affirmer que l'enzyme fixée dans l'organisme voit son site actif modifié (55).

Les immunosorbants sont très utiles pour isoler certaines protéines par chromatographie d'affinité. Cette méthode est très supérieure aux autres car elle est d'une grande spécificité (20). De même, en fixant un inhibiteur sélectif d'une certaine enzyme sur un support hydrophile et en plaçant ce dérivé insoluble dans une colonne, on peut, par percolation continue d'une solution d'enzyme impure, obtenir la fixation spécifique de l'enzyme sur son inhibiteur. Par simple changement de pH, on obtient, en fin de réaction, l'enzyme pure en solution. La carboxypeptidase et l' α -chymotrypsine sont ainsi purifiées sur des dérivés de l'agarose (102). Les inhibiteurs fixés au support par liaison covalente sont le L-tyrosine-D-tryptophane pour la première enzyme, et le D-tryptophane méthylester pour la seconde. L'acide acétique dilué (pH 3) permet l'élution de l'enzyme purifiée dans les deux cas considérés (102).

La grande spécificité de la méthode est mise en évidence dans le cas de la phosphodiesterase et de la nucléase qui hydrolysent toutes deux les acides nucléiques en fragments phosphorylés. La phosphodiesterase n'est pas retenue par le support sur lequel est fixé un inhibiteur de la nucléase (102). D'autre part, on a pu montrer, grâce à la chromatographie d'affinité, que l'activité résiduelle d'une solution de nucléase désactivée par un inhibiteur différent du précédent (102), est due à un reste d'enzyme native et non pas à une inhibition partielle de l'enzyme désactivée (103).

5. Utilisation en médecine

La chromatographie d'affinité sert également à isoler des anticorps adsorbés dans des colonnes d'antigènes insolubilisés. Ces anticorps sont alors séparés des antigènes par élution. Ils ne peuvent pas être purifiés par une autre méthode car leur précipitation en solution peu concentrée est impossible (10). Cette méthode peut être utilisée en transplantation d'organes pour fixer sur des immunosorbants (antigènes) les anticorps responsables des crises de rejet (104).

Les lymphoblastes responsables de la leucémie vivent grâce à la présence d'asparagine (105). Celle-ci peut être décomposée par l'enzyme L-asparaginase. Mais si l'on introduit cette enzyme dans le corps humain, il se produit des accidents secondaires avec effet toxique, en particulier chez les enfants. D'où l'idée d'éviter l'introduction de l'enzyme dans le corps humain. Dans ce but on réalise un support de plaques ou perles de verre sur lesquelles l'enzyme est fixée de façon permanente. Le sang est détourné du circuit sanguin et passe

sur le support renfermant l'enzyme qui décompose l'asparagine. Le sang ainsi épuré est réinjecté dans l'organisme. L'enzyme ne pénétrant plus dans le corps du malade, tous les effets secondaires toxiques sont éliminés (105). De même l'asparaginase peut être fixée sur un tube de nylon partiellement hydrolysé, technique qui est expérimentée avec succès in vivo sur des chiens normaux et leucémiques : le taux d'asparagine dans l'organisme diminue d'une façon notable (85). Dans ce cas, le tube de nylon est introduit comme élément du circuit sanguin et le sang passe à l'intérieur.

Plus de 120 maladies connues sont dues à des anomalies du métabolisme interne. Parmi elles, un grand nombre provient d'une déficience en enzymes. Celles-ci sont absentes de l'organisme ou inactives. Si on introduit à l'intérieur du corps humain les enzymes nécessaires sous forme insolubilisée, les déficiences constatées peuvent être supprimées. Ainsi l'uréease, enfermée dans des microcapsules insolubles et introduite dans l'organisme par injection intrapéritonique, transforme l'urée du sang en carbonate d'ammonium. Les ions ammonium toxiques peuvent être récupérés par un absorbeur ou transformés en composés azotés non toxiques par une glutamique (104 et 106). De même, des microcapsules de catalase (104), d'anhydrase carbonique ou de trypsine (59) sont expérimentées in vivo par injection intrapéritonique ou intramusculaire. Une autre maladie bien connue est due à l'absence d'une enzyme particulière : les arriérés mentaux présentent une carence d'histidinase, enzyme qui transforme la phénylalanine en tyrosine. Une administration orale de microcapsules d'histidinase immobilisée permet d'éviter l'aggravation de cette maladie (107).

VIII - CONCLUSION

L'examen des catalogues récents de produits chimiques met en lumière la commercialisation naissante des enzymes immobilisées ou des supports macromoléculaires permettant de les préparer. Le prix élevé de ces substances est sans doute un frein à leur grande diffusion et semble exclure pour le moment leur emploi massif dans des réactions à l'échelle industrielle. D'autre part, l'utilisation à grande échelle est quelque peu bloquée par un taux de transformation du substrat beaucoup trop faible (108). Mais le chiffre d'affaires de l'industrie des enzymes dépassant déjà plusieurs milliards de nouveaux francs (109), il est certain qu'un développement important ne saurait tarder. Il reste deux grandes voies à développer : tout d'abord, mettre au point des méthodes d'immobilisation des enzymes permettant des transformations de substrat plus importantes (110) ; ensuite synthétiser des polymères qui présentent des propriétés enzymatiques acceptables (synzymes). Ces nouveaux réactifs devraient jouer un rôle considérable dans l'industrie (110).

B I B L I O G R A P H I E

- 1) P.V. SUNDARAM, E.K. PYE, T.M.S. CHANG, V.H. EDWARDS, A.E. HUMPHREY, V.O. KAPLAN, E. KATCHALSKI, Y. LEVIN et M.D. LILLY, Biotechnol. Bioeng. Symp., 1972, 3, 15.
- 2) E.M. CROOK et G. KAY, Brevet Sud Africain n° 68 04 010, 1968 (Chem. Abstr., 1969, 71, 14 363y).
- E. BROWN, A. RACOIS et H. GUENIFFEY, Tetrahedron Letters, 1970, 25, 2139.
- 3) A. BAR ELI et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1963, 238, 1689.
- E. BROWN et A. RACOIS, Bull. Soc. chim., 1971, 12, 4351.
- 4) L. GOLDSTEIN, M. PECHT, S. BLUMBERG, D. ATLAS et Y. LEVIN, Biochemistry, 1970, 9 (11), 2322.
- 5) E.M. CROOK, K. BROCKLEHURST et C.W. WHARTON, Methods Enzymol., 1970, 19, 963.
- 6) G. MANECKE, G. GÜNZEL et H.J. FORSTER, J. Polymer Sci., 1970, 30 (C), 607.
- 7) P. CUATRECASAS, J. Biol. Chem., 1970, 245, 3059.
- 8) J. PORATH, R. AXEN et S. ERNBACK, Nature, 1967, 215, 1491.
- 9) P. BERNFELD, R.E. BIEBER et P.C. Mac DONNELL, Arch. Biochem. Biophys., 1968, 127, 779.
- 10) I.H. SILMAN et E. KATCHALSKI, Ann. Rev. Biochem., 1966, 35 (II), 873.
- 11) R. AXEN et J. PORATH, Nature, 1966, 210, 367.
- 12) G. MANECKE et H.J. FORSTER, Makromol. Chem., 1962, 51, 199.
- 13) G. MANECKE et G. GÜNZEL, Makromol. Chem., 1966, 91, 136.
- 14) G. MANECKE et G. GÜNZEL, Naturwissenschaften, 1967, 54, 531.
- 15) C.J. EPSTEIN et C.B. ANFINSEN, J. Biol. Chem., 1962, 237, 2175.
- 16) E. RIESEL et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1964, 239, 1521.
- 17) L. GOLDSTEIN, Anal. Biochem., 1972, 50 (1), 40.
- 18) Y. LEVIN, M. PECHT, L. GOLDSTEIN et E. KATCHALSKI, Biochemistry, 1964, 3, 1905.
- 19) W. BRÜMMER, N. HENNRICH, M. KLOCKLOW, H. LANG et H.D. ORTH, Europ. J. Biochem., 1972, 25, 129.
- 20) H.D. ORTH et W. BRÜMMER, Angew. Chem. internat. Edit., 1972, 11 (4), 249.
- 21) M. MIYAMURA et S. SUZUKI, Nippon Kagaku Kaishi, 1972, 8 (7), 1274.
(Chem. Abstr., 1972, 77, 165 224 d).

- 22) E.M. CROOK, Metab. Regul. Enzyme Action, Fed. Eur. Biochem. Soc. Meet., 1969, 6, 297.
(Chem. Abstr., 1971, 74, 107 645 n).
- 23) R.D. LILLY, Symposium sur les protéines chimiquement greffées et réticulées, Rouen, 15 Septembre 1972.
- 24) G.J.H. MELROSE, Rev. Pure Appl. Chem., 1971, 21, 83.
- 25) R. AXEN et S. ERNBACK, Europ. J. Biochem., 1971, 18, 351.
- 26) C.K. GLASSMEYER et J.D. OGLE, Biochemistry, 1971, 10, 786.
- 27) P. CRESSWELL et A.R. SANDERSON, Biochem. J., 1970, 119, 447.
- 28) L. GOLDSTEIN et E. KATCHALSKI, Z. Anal. Chem., 1968, 243, 375.
- 29) W.E. HORNBY, M.D. LILLY et E.M. CROOK, Biochem. J., 1968, 107, 669.
- 30) L. GOLDSTEIN, Y. LEVIN et E. KATCHALSKI, Biochemistry, 1964, 3, 1913.
- 31) A.D. Mc LAREN, Enzymologia, 1960, 21, 356.
- 32) A.D. Mc LAREN, Advan. Enzymol., 1966, 29, 28.
- 33) J.H. WILSON et M.D. LILLY, Biotechnol. Bioeng., 1969, 11, 349.
- 34) M.D. LILLY et A.K. SHARP, The Chem. Eng., 1968, 215, CE 12.
- 35) W.E. HORNBY, M.D. LILLY et E.M. CROOK, Biochem. J., 1966, 98, 420.
- 36) I.H. SILMAN, M. ALBU-WEISSENBERG et E. KATCHALSKI, Biopolymers, 1966, 4, 441.
- 37) K.F. O'DRISCOLL, Chem. & Eng. News, 4 Septembre 1972, p. 17.
- 38) G. MANECKE, Biochem. J., 1968, 107, 2 P.
- 39) M.A. MITZ et R.J. SCHLUETER, J. am. chem. Soc., 1959, 81, 4024.
- 40) M.D. LILLY, C. MONEY, W. HORNBY et E.M. CROOK, Biochem. J., 1965, 95, 45 P.
- 41) G. KAY et M.D. LILLY, Biochim. Biophys. Acta, 1970, 198, 276.
E. BROWN et A. RACOIS, Bull. Soc. chim., 1971, 12, 4357.
- 42) A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, Nature, 1960, 188, 856.
- 43) J.F. KENNEDY, S.A. BARKER et A. ROSEVEAR, J.C.S. Perkin I, 1972, 20, 2568.
- 44) E.B. ONG, Y. TSANG et G.E. PERLMANN, J. Biol. Chem., 1966, 241, 5661.
- 45) R. GOLDMAN, I.H. SILMAN, S.R. CAPLAN, O. KEDEM et E. KATCHALSKI, Science, 1965, 150, 758.
- 46) J.J. CEBRA, D. GIVOL, I.H. SILMAN et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1961, 236, 1720.

- 47) W.M. LEDINGHAM et W.E. HORNBY, FEBS Letters, 1969, 5, 118.
- 48) M.A. MITZ et L.J. SUMMARIA, Nature, 1961, 189, 576.
- 49) A.F.S.A. HABEED, Arch. Biochem. Biophys., 1967, 119, 264.
- 50) M. CESKA, Experientia, 1971, 27 (7), 767.
- 51) F.C. HARTMAN et F. WOLD, Biochemistry, 1967, 6, 2439.
- 52) T. IKENAKA, J. Biochem., 1959, 46, 297.
- 53) S. SUZUKI, Y. HACHIMORI et R. MATOBA, Bull. Chem. Soc. Japan, 1970, 43, 3849.
- 54) B. MATTIASON et K. MOSBACH, Biochim. Biophys. Acta, 1971, 235, 253.
- 55) H.D. BROWN, S.K. CHATTOPADHYAY et A. PATEL, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1966, 25, 304.
- 56) G.P. HICKS et S.J. UPDIKE, Anal. Chem., 1966, 38, 726.
- 57) R.J.H. WILSON, G. KAY et M.D. LILLY, Biochem. J., 1968, 108, 845.
- 58) G. BROWN, E. SELEGNY, S. AVRAMEAS et D. THOMAS, Biochim. Biophys. Acta, 1969, 185, 260.
- 59) T.M.S. CHANG, Science, 1964, 146, 524.
- 60) K.P. WHEELER, B.A. EDWARDS et R. WHITTAM, Biochim. Biophys. Acta, 1969, 191, 187.
- 61) R. WHITTAM, B.A. EDWARDS et K.P. WHEELER, Biochem. J., 1968, 107, 3 P.
E. BROWN et A. RACOIS, Travaux non publiés.
- 62) E.M. CROOK, Biochem. J., 1968, 107, 1 P.
- 63) C.W. WHARTON, E.M. CROOK et K. BROCKLEHURST, European J. Biochem., 1968, 6, 572.
- 64) R.P. PATEL, D.V. LOPIEKES, S.P. BROWN et S. PRICE, Biopolymers, 1967, 5, 577.
- 65) A.B. PATEL, S.N. PENNINGTON et H.D. BROWN, Biochim. Biophys. Acta, 1969, 178, 626.
- 66) N. WELIKY, F.S. BROWN et E.C. DALE, Arch. Biochem. Biophys., 1969, 131, 1.
- 67) R. GOLDMAN, O. KEDEM, I.H. SILMAN, S.R. CAPLAN et E. KATCHALSKI, Biochemistry, 1968, 7, 486.
- 68) R. AXEN, E. HEILBRONN et A. WINTER, Biochim. Biophys. Acta, 1969, 191, 478.
- 69) M.L. GREEN et G. CRUTCHFIELD, Biochem. J., 1969, 115, 183.
- 70) M.A. STAHMANN et Y. OHNO, Macromolecules, 1971, 4 (3), 350.
- 71) O.R. ZABORSKY, Biotechnol. Bioeng. Symp., 1972, n° 3, 211.
- 72) H.H. WEETALL, Science, 1969, 166, 615.

- 73) M.A. MITZ, Science, 1956, 123, 1076.
- E.BROWN et A. RACOIS, Tetrahedron Letters, 1972, 50, 5077.
- 74) K. OGATA, M. OTTESEN et L. SVENDSEN, Biochim. Biophys. Acta, 1968, 159, 403.
- 75) W.N. ARNOLD, Arch. Biochem. Biophys., 1966, 113, 451.
- 76) K. MOSBACH et R. MOSBACH, Acta Chem. Scand., 1966, 20, 2807.
- 77) P. MONSAN et G. DURAND, C.R. Aca. Sc. Paris, 1971, 273 (1), 33.
- 78) W.E. HORNBY et H. FILIPPUSSEN, Biochim. Biophys. Acta, 1970, 220 (2), 343.
- 79) A. TRAUB, E. KAUFMANN et Y. TEITZ, Anal. Biochem., 1969, 28, 469.
- 80) Chem. Eng. News, 1969, 47 (48), 25.
- 81) M.D. LILLY, W.E. HORNBY et E.M. CROOK, Biochem. J., 1966, 100, 718.
- 82) S. USAMI, M. MATSUBARA et J. NODA, Hakko Kyokaishi, 1971, 29 (4), 195.
(Chem. Abstr., 1972, 76 (21), 123 528 c).
- 83) H.H. WEETAL et N. WELIKY, Anal. Biochem., 1966, 14, 160.
- 84) G. KAY, M.D. LILLY, A.K. SHARP et R.J.H. WILSON, Nature, 1968, 217, 641.
- 85) G. BARRIE KITTO, J.P. ALLISON, L. DAVIDSON, S. RALEIGH et M. CHRISTIAN, Symposium sur les protéines chimiquement greffées et réticulées, Rouen, 15 Septembre 1972.
- 86) A.L. SHRIER, Biotechnol. Bioeng. Symp., 1972, n° 3, 323.
- 87) T. TOSA, T. MORI et I. CHIBATA, Agr. Biol. Chem., 1969, 33, 1053.
- 88) D.A. SELF, G. KAY, M.D. LILLY et P. DUNNILL, Biotechnol. Bioeng., 1969, 11, 337.
- 89) K. MOSBACH et P. LARSSON, Biotechnol. Bioeng., 1970, 12, 19.
- 90) C.H. HOFFMANN, E. HARRIS, S. CHODROFF, S. MICHELSON, J.N. ROTHROCK, E. PETERSON et W. REUTER, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 41, 710.
- 91) H.G. GASSEN, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, 44, 1410.
- 92) S.J. UPDIKE et G.P. HICKS, Science, 1967, 158, 270.
- 93) S.J. UPDIKE et G.P. HICKS, Nature, 1967, 214, 986.
- 94) G.G. GUILBAULT et J.G. Jr. MONTALVO, J. am. chem. Soc., 1969, 91, 2164.
- 95) G.G. GUILBAULT et D.N. KRAMER, Anal. Chem., 1965, 37, 1675.
- 96) Chem. Eng. News, 15 Février 1970, p. 86.
- 97) B.V. WEINRICH, J.H. JOHNSON, B.S. WILDI et D.C. BOYLE, Brevet américain n° 3 597 220
(Chem. Abstr., 1971, 75, 128 507 m et 128 508 n).

- 98) F.E. GOULD et T.H. SHEPHERD, Brevet américain n° 3 681 248, 1er Août 1972
(Chem. Abstr., 1972, 77, 152 911 a).
- 99) B.S. WILDI, T.L. WESTMAN et L. KEAY, Brevet allemand n° 1 948 298, 26 Novembre 1970.
(Chem. Abstr., 1971, 74 (10), 45 612 v).
- 100) H.E. FEIERSTEIN, Brevet américain n° 3 594 325, 20 Juillet 1971.
(Chem. Abstr., 1971, 75, 95 016 v).
- 101) C. BECK et A.L. TAPPEL, Biochim. Biophys. Acta., 1968, 151, 159.
- 102) P. CUATRECASAS, M. WILCHEK et C.B. ANFINSEN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1968, 61, 636.
- 103) P. CUATRECASAS, J. Biol. Chem., 1970, 245, 574.
- 104) T.M.S. CHANG, Science Tods, 1969, 16, 33.
- 105) Information Chimie, Août 1972, 111, p. 53.
- 106) K. MOSBACH, Sci. Amer., 1971, 224 (3), 26.
- 107) Chem. Eng. News, 1969, 47 (40), 44.
- 108) DELECOURT, Bull. Soc. chim., 1970, suppl. 14b, p. 38.
- 109) D.N. KRAMER et R. FORD, Sci. Technol., 1967, 64, 70.
- 110) S.A. BARKER, Chem. Ind. (Londres), 1972, 9, 371.

N° 734. — Enzymes insolubilisées.

I. — Préparation de nouveaux supports macromoléculaires : Les polyméthacrylates d' ω -iodo- n -alcoyle (poliodals) (*),

par Éric BROWN, André RACOIS

(Laboratoire de synthèse organique, Faculté des Sciences, 72-Le Mans.)

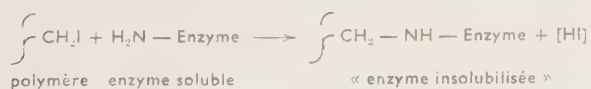
et H. GUENIFFEY.

(Laboratoire de chimie macromoléculaire, Faculté des Sciences, 72-Le Mans.)

(Manuscrit reçu le 8.6.71.)

On décrit la préparation et les propriétés physiques de polymères réactifs d'un type nouveau, les *Poliodals*, qui sont susceptibles de réagir sur les enzymes pour donner des combinaisons enzyme-support insolubles dans l'eau et biologiquement actives. Les *Poliodals* sont des homopolymères (ou des copolymères avec le méthacrylate de méthyle) de méthacrylate d'iodo-2 éthylique ou d'iodo-4 butyle, respectivement.

Dans le but de préparer de nouveaux types d'enzymes insolubilisées, nous nous sommes proposés de synthétiser des supports macromoléculaires différents de ceux utilisés jusqu'à présent. Ces polymères sont, d'une manière générale, des polyméthacrylates d' ω -iodo- n -alcoyle possédant des groupements terminaux $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{I}$, susceptibles de réagir sur les $-\text{NH}_2$ libres des enzymes selon le schéma probable :

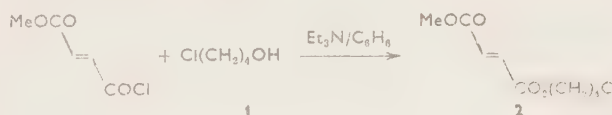


(*) Une « Mise au point » sur les enzymes insolubilisées, rédigée par les auteurs, est publiée dans ce fascicule à la fin de cette rubrique.

1. — Synthèse des polymères.

*Fumarate de méthyle
et de chloro-4 n -butyle (2).*

Nous avons tout d'abord entrepris la préparation d'un fumarate de chloro-4 n -butyle à partir de chloro-4 butanol-1 **1** et de chlorure de *trans*- β -méthoxycarbonylacrylyle, selon la réaction :



L'ester chloré **2** très stable peut être conservé plusieurs mois à température ambiante après distillation. Malheureusement, sa purification est malaisée et d'autre part, sa polymérisation radicalaire très lente (72 h) ne donne que des produits de faible masse moléculaire, ce qui est en accord avec les résultats connus concernant la polymérisation des fumarates et des maléates (1, 2).

Acrylate de chloro-4 n-butyle 3.

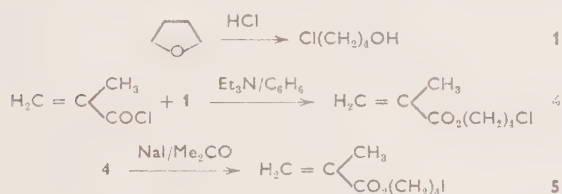
Nous avons préparé l'acrylate **3** à partir de chlorure d'acrylyle et de chloro-4 butanol **1**:



La polymérisation de cet ester **3**, amorcée par l'azobisisobutyronitrile (AIBN) ou le peroxyde de benzoyle, a fourni des polymères huileux, de masses moléculaires inférieures à 5 000, impropres par conséquent à la préparation d'enzymes insolubilisées.

Polyméthacrylate d'iodo-4 n-butyle (Polioidal-4).

En partant de tétrahydrofurane et de chlorure de méthacrylyle, nous avons préparé les méthacrylates de chloro-4 et iodo-4 n-butyle **4** et **5** de la façon suivante:



Il convient de noter qu'une préparation de l'ester chloré **4** a déjà été décrite dans la littérature (3). Sa polymérisation (en vue d'études dilatométriques) a été amorcée par le peroxyde de benzoyle (4) mais la masse moléculaire des produits formés ne semble pas avoir été précisée. Dans la littérature (3), le monomère est obtenu par estérification de l'acide méthacrylique au moyen de chloro-4 butanol-1 **1** en utilisant l'acide sulfurique comme catalyseur.

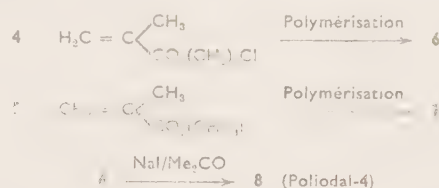
Les esters **4** et **5** sont stables en solution dans le benzène mais à l'état pur ils doivent être conservés à 0° afin d'éviter une polymérisation thermique en masse. On doit les distiller sous vide, la distillation moléculaire donnant les meilleurs résultats. L'ester iodé **5** présente en outre l'inconvénient de brunir assez rapidement à la lumière (environ 1 heure) par libération d'iode. Il est cependant possible de le conserver à froid à l'obscurité pendant environ un mois.

L'ester chloré **4** n'a pu être polymérisé par voie anionique même à -70°, ceci vraisemblablement en raison de la grande réactivité, vis-à-vis du chlore, des amorceurs employés (naphthalène-sodium, butyl-lithium, AlLiH_4 et $\text{C}_6\text{H}_5\text{MgBr}$). Les essais ont été tout aussi infructueux avec l'ester iodé **5**. Les échecs rencontrés lors de nos tentatives pour polymériser l'ester chloré **4** au moyen de SnCl_4 (polymérisation cationique) s'expliquent par la complexation du promoteur par les atomes d'oxygène du monomère.

Une polymérisation du type Ziegler-Natta réalisée à -30° a fourni un produit insoluble dans les solvants usuels, difficile à purifier (reste de métaux nuisibles aux enzymes), et dont l'étude n'a pas été poursuivie.

Des polymérisations radicalaires au moyen de peroxyde

de benzoyle et d'azobisisobutyronitrile ont été entreprises avec succès sur les deux esters **4** et **5**:



Les rendements et les masses moléculaires des produits obtenus sont satisfaisants pour le polymère chloré **6**, mais sont plus faibles dans le cas du monomère iodé **5**.

Nous avons alors entrepris l'iodation du polymère chloré **6**. La substitution du chlore par l'iode dans celui-ci est presque quantitative en utilisant l'iodure de sodium dans l'acétone, de la même façon que pour le monomère **5**. La masse moléculaire du polymère **8** ainsi obtenu est nettement supérieure à celle du polymère **7**. Avec l'iodure de potassium, la substitution se fait avec un moins bon rendement. Le fait que la substitution du chlore par l'iode ne soit pas quantitative n'est pas gênant, les atomes de chlore non substitués se trouvent vraisemblablement dans des sites peu réactifs et par conséquent peu susceptibles de fixer des enzymes.

En effectuant la polymérisation en solution plus concentrée, nous avons obtenu, avec un rendement de 100 %, un produit insoluble dans tous les solvants organiques usuels. Ce polymère donne de très mauvais résultats en ce qui concerne la fixation de l'uréase, vraisemblablement en raison de la faible solvation du réseau macromoléculaire et de la grande taille de la molécule d'enzyme (5).

Copolymère de méthacrylate de méthyle et de méthacrylate de iodo-4 n-butyle (Copoliodals-4).

Afin de diminuer le nombre de groupements réactifs sur les polymères, et par voie de conséquence leur prix de revient, nous avons entrepris la synthèse de divers copolymères statistiques du méthacrylate de méthyle et du méthacrylate de chloro-4 ou d'iodo-4 n-butyle. Les copolymères ont été préparés par voie radicalaire en utilisant des mélanges contenant 1 g de méthacrylate d'iodo-4 n-butyle **5** pour 1, 2, 3 ou 5 g de méthacrylate de méthyle. Dans la suite du texte, ces copolymères seront désignés sous les noms de *Copoliodals-411*, *412*, *413*, et *415* respectivement, le premier chiffre indiquant le nombre d'atomes de carbone des chaînes latérales iodoalcoyles et les deux autres, les masses de monomère **5** et de méthacrylate de méthyle utilisées dans la préparation du copolymère. Des copolymères chlorés ont été préparés à partir du méthacrylate **4** dans les mêmes conditions et en utilisant les mêmes préparations pondérales de monomères. Les analyses de ces copolymères chlorés ont montré que leurs compositions étaient les mêmes que celles des mélanges de monomères utilisés pour les préparer.

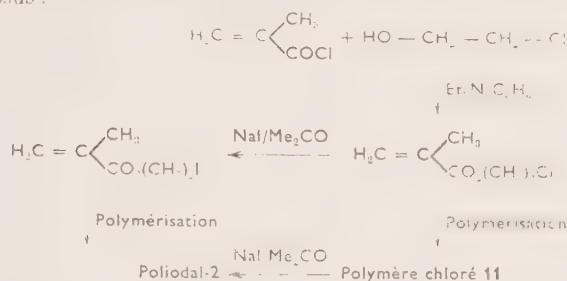
L'iodation des copolymères chlorés n'étant pas totale, même avec l'iodure de sodium, nous avons préféré utiliser les copolymères iodés synthétisés directement à partir du monomère iodé **5**.

Les masses moléculaires des produits obtenus, de l'ordre de 65 000 à 73 000, sont sensiblement identiques pour les différents copolymères iodés préparés par iodation du copolymère chloré ou par copolymérisation du monomère iodé **5**.

Le monomère iodé **5** est difficile à obtenir pur: il contient presque toujours un peu de monomère chloré **4** dont la polymérisation est un peu plus rapide et qu'on retrouve par conséquent dans les *Copoliodals-4*. Mais, là encore, ce fait n'est pas gênant si l'on considère l'usage auquel ces copolymères sont destinés.

*Polymère et copolymère
dérivés du méthacrylate d'iodo-2 éthyle
(Poliodal-2 et Copoliodals-2).*

Les méthacrylates de chloro-2 et iodo-2 éthyle **9** et **10** ont été préparés et polymérisés par voie radicalaire de la même façon que leurs homologues respectifs **4** et **5** ci-dessus :



Il convient de noter que le monomère chloré **9** et le polymère correspondant **11** ont déjà été décrits dans la littérature (4, 6). La polymérisation du monomère iodé **11** conduit au *Poliodal-2*, le chiffre 2 représentant le nombre d'atomes de carbone présents dans les chaînes latérales iodoalcoyles du polymère.

L'iodation du monomère **9** et celle du polymère **11** sont notablement plus lentes que pour leurs analogues chlorés **4** et **6** décrits précédemment : le reflux de l'acétone doit être maintenu deux fois plus longtemps.

Alors que la masse moléculaire en nombre du polymère chloré **11** est d'environ 170 000, celle du *Poliodal-2* atteint 140 000 ou 200 000 si celui-ci a été préparé respectivement à partir du monomère iodé **10**, ou du polymère chloré **11**. Cette dernière méthode permet d'ailleurs d'obtenir des quantités importantes de polymère.

Les copolymères de méthacrylate de méthyle et d'iodo-2 éthyle sont préparés de la même façon que les *Copiodals-4* décrits ci-dessus. Ils seront désignés dans la suite du texte sous les noms de *Copiodals-211*, *212*, *213* et *215*, les deux derniers chiffres de chacun de ces nombres ayant la même signification que dans le cas des *Copiodals-4*. La masse moléculaire moyenne des *Copiodals-2* oscille entre 68 000 et 75 000.

Polyméthacrylate de n-butyle.

Il nous a paru intéressant d'étudier la physisorption des enzymes protéolytiques sur des supports méthacryliques, structuralement semblables aux *Poliodals*, mais dépourvus de groupements fonctionnels réactifs. Dans ce but, nous avons préparé le polyméthacrylate de *n*-butyle de la même façon que son analogue iodé, le *Poliodal-4*, afin d'obtenir un polymère de tacticité et de degré de polymérisation comparables. La préparation et la polymérisation du méthacrylate de *n*-butyle ont déjà été décrites dans la littérature (7, 8).

2. — Étude physique des polymères.

Afin d'avoir une idée aussi exacte que possible des propriétés physiques de nos polymères, nous avons déterminé leurs masses moléculaires moyennes en nombre et leurs degrés de polymérisation. Des courbes de chromatographie sur gel (*GPC*) nous ont permis de connaître la répartition des masses moléculaires des différentes chaînes composant chaque polymère. Enfin nous avons fait une étude en résonance magnétique nucléaire de la tacticité des divers polymères pour juger de l'influence possible du volumineux groupement $-\text{CH}_2\text{I}$ sur la stéréorégularité de la macromolécule.

*Masse moléculaire moyenne
et degré de polymérisation.*

Nous avons mesuré la masse moléculaire moyenne des divers polymères en solution dans le benzène au moyen d'un osmomètre à membrane Hewlett-Packard, modèle 501. Les différents polymères à deux carbones sur la chaîne latérale halogénoalcoyle ont des masses moyennes supérieures aux polymères correspondants à quatre carbones et par conséquent des degrés de polymérisation plus élevés. Ainsi le *Poliodal-2* a une masse moyenne de 200 000 et un degré de polymérisation voisin de 830 alors que les valeurs correspondantes pour le *Poliodal-4* sont respectivement 100 000 et 370.

*Distribution des polymères
en fonction de la masse moléculaire.*

La répartition des masses des chaînes macromoléculaires dans les différents échantillons synthétisés a été étudiée au moyen d'un chromatographe de *GPC* Waters associées. Les copolymères chlorés et iodés ainsi que le polyméthacrylate de butyle décrits ci-dessus, présentent tous une distribution statistique des masses. Les diagrammes de distribution sont des courbes en cloche plus ou moins aplaties selon les échantillons. Les homopolymères chlorés présentent des diagrammes de distribution du même type, quoique dissymétriques, le maximum se trouvant déplacé vers les petites masses, ce qui indique une dispersion plus importante pour les grandes molécules que pour les petites (voir partie expérimentale). L'examen de ces différentes courbes montre que les masses moléculaires extrêmes sont voisines de 5 000 et 800 000.

Par contre, le *Poliodal-2* et le *Poliodal-4* présentent des diagrammes de distribution d'un type différent qui montrent que la répartition des masses moléculaires n'est pas statistique, mais pratiquement constante dans un domaine assez étendu (voir partie expérimentale). Ces polymères contiennent donc en proportions importantes des molécules de faibles masses, susceptibles de donner après fixation d'une enzyme des combinaisons colloïdales d'une insolubilité douteuse.

Tacticité des polymères.

Les spectres de RMN de divers polyméthacrylates ont été étudiés en détail dans la littérature (9 à 11), les spectrographes utilisés opérant à 60, 100 et 220 MHz. Les résultats obtenus montrent que les protons du méthyle en α de la fonction carboxylique donnent trois pics caractéristiques formant une « triade » aux environs de $\delta = 1$ ppm. Si on se déplace dans le sens des champs croissants, ces trois pics correspondent respectivement aux enchainements isotactique I (répartition régulière des méthyles sur la macromolécule), hétérotactique H (répartition anarchique des méthyles) et syndiotactique S (répartition alternée des méthyles).

On sait également que les protons des $-\text{CH}_2-$ de la chaîne polyméthacrylique donnent des signaux en RMN (δ de 1,5 à 2,5 ppm) qui forment des « diades » dans le cas de polymères I ou S et des « tétrades » pour les polymères I, H et S. Les spectres peuvent être difficiles à interpréter s'il reste du monomère dans le produit (apparition d'une « triade » à $\delta = 1,85 - 2$ ppm) (12) ou dans le cas de copolymères d'acide et d'ester méthacryliques (pics à $\delta = 0,82 - 1$ ppm) (13) pour lesquels le nombre de pics dépend des proportions relatives d'acide et d'ester.

Afin d'étudier l'influence de la grosseur de l'atome d'iode sur l'enchainement des motifs monomères lors de la polymérisation, nous avons entrepris une étude détaillée de la tacticité de nos polymères. Par hydrolyse en milieu sulfurique (13), le *Poliodal-4* a fourni un polyacide méthacrylique (PAMA), qui par action du diazométhane (14) a

conduit au polyméthacrylate de méthyle (PMAM) correspondant. Enfin, le polyalcool attendu a été obtenu par action d'aluminohydrure de lithium (15) sur le *Poliodal-4*. Une étude en RMN des différents polymères ainsi préparés a été effectuée au moyen d'un spectrographe *JEOL Minimar 100* (opérant à 100 MHz). Afin d'obtenir des pics plus grands et mieux résolus (16, 17), les spectres du polyester de départ, le *Poliodal-4*, du PMAM et du PAMA, ont été pris à 100° en solution dans le diméthylsulfoxyde deutérié. Le spectre du polyalcool, en solution dans la pyridine pure, a été également réalisé à 100°. Un examen détaillé des pics constituant la « triade » due aux méthyles de la chaîne montre que ces quatre polymères ont des tacticités sensiblement identiques avec prédominance syndiotactique, un fort pourcentage d'enchaînements hétérotactiques et très peu d'enchaînements isotactiques. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui indique que la polymérisation radicalaire du méthacrylate de méthyle conduit à la formation des trois types d'enchaînements avec prédominance syndiotactique (9) et que la structure syndiotactique est favorisée par la répulsion entre les substituants à l'extrémité croissante du polymère en formation et ceux du monomère qui vient compléter la chaîne (18). Cette dernière hypothèse est vérifiée dans le cas des méthacrylates d'alcyle (9). Nous avons effectué des études semblables sur le *Copoliodal-413* et le polyméthacrylate de chloro-2 éthyle **11** avec des résultats identiques en ce qui concerne la tacticité. Les similitudes dans la littérature (9) entre les spectres de RMN du PAMA et du PMAM montrent que la structure I, H ou S d'un enchaînement est indépendante de celle des enchaînements immédiatement voisins.

En ce qui nous concerne, il apparaît donc que la présence d'un gros substituant iode sur le *Poliodal-4* n'influe pas sur la tacticité de cet ester polyméthacrylique, et les *Poliodals-2* semblent avoir une prédominance syndiotactique un peu plus marquée que les *Poliodals-4* correspondants.

Une étude précise du spectre infrarouge peut fournir également des renseignements importants sur la tacticité des polymères méthacryliques. Ainsi la vibration de valence $\nu_{C=O}$ présente trois valeurs différentes pour chacun des enchaînements I, H ou S (19) : 1 732 cm^{-1} pour I, 1 724 cm^{-1} pour H et 1 728 cm^{-1} pour S. Les bandes C — O — C de l'ester sont également différentes : 1 255 cm^{-1} pour I et 1 236 pour S (le rapport des densités optiques D_{1255}/D_{1236} croît comme le caractère isotactique) (20). De plus on observe un épaulement à 1 050 ou 1 060 cm^{-1} pour S mais pas pour I (21).

Le spectre du *Poliodal-4* que nous avons synthétisé présente un épaulement à 1 060 cm^{-1} , les deux pics attendus à 1 236 et 1 255 cm^{-1} avec T_{1236}/T_{1256} inférieur à 1) et un pic avec épaulements pour la vibration de valence $\nu_{C=O}$. L'étude en infrarouge confirme donc les résultats fournis par la spectrométrie de RMN, à savoir que le *Poliodal-4* comporte les trois types d'enchaînements I, H et S avec toutefois prédominance d'une structure syndiotactique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Les masses moléculaires moyennes en nombre ont été déterminées par osmométrie en solution benzénique au moyen d'un osmomètre à membrane Hewlett-Packard, modèle 501. Elles sont désignées par le symbole *M_n* dans la suite du texte.

Fumarate de méthyle et de chloro-4 n-butyle **2**.

a) Chloro-4 butanol-1 **1**.

Ce composé a été préparé selon la littérature (22). On fait barboter un courant d'HCl gazeux dans un tricol de 500 cm^3 muni d'un

thermomètre et d'un réfrigérant efficace et contenant 200 g de tétrahydrofurane purifié. On chauffe alors à reflux jusqu'à ce que la température du liquide atteigne 103-105° (15 h). Par distillation sous pression réduite, on recueille 154 g (51 %) de chloro-4 butanol-1 **1** [rendement indiqué (21) : 56 %] dont le point d'ébullition E_{b14} = 81-82° est en accord avec la littérature (22 à 24).

b) Chlorure de trans β -méthoxycarbonylacrylyle.

Dans un réacteur d'un litre muni d'un réfrigérant et d'un agitateur mécanique, on introduit successivement 392 g (4 moles) d'anhydride maléique et 800 cm^3 de méthanol purifié. On agite une nuit à température ambiante. On chasse l'excès de méthanol sous pression réduite, on ajoute lentement (1 h) au résidu un mélange de 375 cm^3 de chlorure de thionyle et de 400 cm^3 de benzène purifié, puis on chauffe au reflux pendant 18 h. Après évaporation du solvant et de l'excès de chlorure de thionyle, on obtient, après deux distillations sous pression réduite, 398 g (52 %) de chlorure d'acide incolore dont le point d'ébullition (E_{b14} = 70°) est en accord avec la littérature (25, 26).

c) Fumarate de méthyle et de chloro-4 n-butyle **2**.

On dispose, dans un bain d'eau à température ambiante, un réacteur d'un litre surmonté d'un réfrigérant, d'une ampoule à rétablissement de pression et d'un agitateur mécanique.

On introduit 146 g de chlorhydrine **1**, 140 g de triéthylamine et 400 cm^3 de benzène distillé puis on ajoute lentement (2 h) une solution de 148 g de chlorure de trans β -méthoxycarbonylacrylyle dans 200 cm^3 de benzène. Il se forme progressivement un dépôt jaunâtre de chlorhydrate d'amine. Après une nuit sous agitation, on filtre sur Büchner, lave le filtrat deux fois avec une solution saturée de bicarbonate de soude puis avec de l'eau distillée. La solution benzénique est séchée (CaCl_2), évaporée, et on distille l'ester **2** sous pression réduite (158 g, Rdt = 72 %). Le produit obtenu est un liquide incolore visqueux, E_{b2} = 120°.

Dans cette préparation, on peut remplacer le benzène par de l'éther et la triéthylamine par de la pyridine (25), mais le rendement est moins bon (60 %).

Analyse $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{ClO}_4$: Calc. % : C 48,97 H 5,84
Tr. : 49,14 5,88.

Spectre IR (film) (cm^{-1}) : $\nu_{(C=O)}$ 1 715 (FF); $\nu_{(C=C)}$ 1 640 (F).

Spectre RMN (CCl_4) (ppm) : δ 6,8 (s) (aire 2) (protons vinyliques); δ 4,25 (massif) (aire 2) ($-\text{O}-\text{CH}_2-$); δ 3,8 (s) (aire 3) ($-\text{O}-\text{CH}_3$); δ 3,6 (massif) (aire 2) ($-\text{CH}_2\text{Cl}$); δ 1,85 (massif) (aire 4) (méthyles en 2 et 3 sur la chaîne butyle).

Polymérisation du fumarate de méthyle et de chloro-4 n-butyle **2**.

a) Avec le peroxyde de benzoyle.

Dans un ballon de 50 cm^3 , on introduit successivement 10 g d'ester **2** et 0,10 g de peroxyde de benzoyle; on laisse 72 h à 90° (27). La purification du polymère est effectuée par dissolution du produit brut dans le benzène suivie de précipitation par l'éther de pétrole, cette opération étant répétée deux fois. Après séchage au dessiccateur sous pression réduite et en présence de paraffine (48 h), on obtient 4,5 g (45 %) d'oligomère se présentant sous la forme d'une huile très visqueuse.

b) Avec l'azobisisobutyronitrile.

Après avoir opéré comme ci-dessus et avec les mêmes quantités, on obtient 3 g (30 %) d'un oligomère analogue au précédent.

Acrylate de chloro-4 n-butyle **3**.

Dans un ballon de 100 cm^3 surmonté d'un réfrigérant, on introduit 72 g (1 mole) d'acide acrylique et 0,2 g de chlorure cuivreux. On ajoute lentement 80 cm^3 (1 mole) de chlorure de thionyle et on chauffe au reflux sous boîte pendant 4 h. On distille à la flamme le produit obtenu et on recueille la fraction passant à 76-78° (36 g, 40 %) dont le point d'ébullition et les spectres sont en accord avec la littérature (28).

Dans un réacteur de 500 cm^3 disposé dans un bain d'eau froide et muni de deux ampoules à rétablissement de pression et d'un agitateur mécanique, on introduit successivement 30 g de chloro-4 butanol-1 **1** et 50 cm^3 de benzène. A la solution agitée, on ajoute simultanément et goutte à goutte (2 h) deux solutions, l'une de 18 g de chlorure d'acrylyle dans 50 cm^3 de benzène, l'autre de 27 g

de triéthylamine dans 50 cm³ de benzène. On laisse réagir une nuit à température ambiante. On filtre pour éliminer le précipité de chlorhydrate d'amino, et lave le filtrat avec une solution saturée de bicarbonate de soude puis avec de l'eau (2 fois). La phase benzénique est séparée, séchée (Na₂SO₄) et évaporée sous pression réduite, laissant un résidu jaune pâle qui est purifié par distillation (Eb₄ = 86°). On obtient ainsi 16 g (50 %) d'ester **3** (liquide incolore). La littérature (3) indique Eb₄ = 68-72°.

Polymérisation de l'acrylate de chloro-4 n-butyle **3**.

Cette polymérisation a été réalisée dans les mêmes conditions que celle du méthacrylate correspondant, avec 1 et 2 % de peroxyde de benzoyle ou d'azobisisobutyronitrile. Après précipitation au méthanol et séchage au dessiccateur, on obtient un oligomère jaune pâle très visqueux qui se réticule rapidement.

Méthacrylate de chloro-4 n-butyle **4**.

Dans un ballon de 100 cm³ surmonté d'un réfrigérant, on introduit 21,5 g d'acide méthacrylique et 0,2 g de chlorure cuivreux. On ajoute lentement 30 g de chlorure de thionyle et on chauffe au reflux sous hotte pendant 4 h. Le produit obtenu est distillé à la flamme et on recueille la fraction de chlorure de méthacrylyle passant à 100-102° (16 g, 60 %) dont le rendement et le point d'ébullition sont en accord avec la littérature (29 et 30).

Spectre IR (film) (cm⁻¹): $\nu_{(C=O)}$ 1 780 (FF); $\nu_{(C=C)}$ 1 640 (F).

Dans un réacteur d'un litre disposé dans un bain d'eau froide et muni d'une ampoule à rétablissement de pression, d'un réfrigérant et d'un agitateur mécanique, on introduit successivement 50 cm³ de benzène, 15 g de chloro-4 butanol-1 **1** et 15 g de triéthylamine (31). Au mélange agité, on ajoute goutte à goutte (2 h) une solution de 15 g de chlorure de méthacrylyle dans 50 cm³ de benzène. On laisse réagir une nuit à température ambiante, filtre deux fois pour éliminer le précipité blanc de chlorhydrate de triéthylamine et lave le filtrat avec une solution saturée de bicarbonate de soude puis avec de l'eau alternativement deux fois. La phase benzénique est séparée, séchée (Na₂SO₄), évaporée au rotavaport et le résidu jaune pâle purifié par distillation moléculaire (Eb_{0,2} = 60°). On obtient ainsi 20 g (80 %) d'ester **4** (liquide incolore). La littérature (3) indique Eb₄ = 84-85°.

Cet ester peut être purifié par distillation sous vide. Dans ce cas, le rendement est souvent moins bon que par distillation moléculaire, du fait d'une résinitiation partielle de l'ester.

Analyse (C₁₂H₁₇ClO₂)_n Calc. % : C 54,4 H 7,4 Cl 20,0
Tr. : 54,62 7,32 19,70
54,62 7,21 19,54.

Spectre IR (film) (cm⁻¹): $\nu_{(C=O)}$ 1 715 (FF); $\nu_{(C=C)}$ 1 640 (F).

Spectre RMN (CCl₄) (ppm): δ 6,05 (massif) (aire 1) (H vinylique); δ 5,55 (massif) (aire 1) (H vinylique); δ 4,15 (triplet) (aire 2) (—O—CH₂—); δ 3,55 (triplet) (aire 2) (—CH₂Cl); massif culminant à 1,9 ppm (aire 7) (—CH₃ et méthylènes en 2 et 3 sur la chaîne butyle).

Polyméthacrylate de chloro-4 n-butyle **6**.

a) Polymérisation anionique.

Divers essais de polymérisation du méthacrylate de chloro-4 n-butyle **4** ont été effectués dans des tubes scellés:

Monomère	Solvant	Température	Amorceur	Temps de réaction	Non solvant ajouté	Résultat
2 g	THF (15 cm ³)	— 70°	BuLi (10 ⁻² mole)	24 h	méthanol	pas de polymérisation
2 g	THF (15 cm ³)	— 70°	naphtalène sodium (10 ⁻⁴ à 10 ⁻³ mole)	24 h	"	"
2 g	THF (15 cm ³)	— 70°	LiAlH ₄ (10 ⁻³ mole)	24 h	"	très léger précipité
2 g	THF (15 cm ³)	— 70°	C ₆ H ₅ MgBr (2 · 10 ⁻² mole)	24 h	"	léger précipité (5 %); spectre RMN conforme

Dans chaque cas, le spectre RMN du liquide résiduel, obtenu après évaporation des solvants, a montré que la grande majorité du monomère **4** n'avait pas réagi et qu'il s'était produit une substitution du chlore par l'anion de l'amorceur. Un peu de polymère de petite masse se forme avec C₆H₅MgBr mais le taux de conversion reste faible.

b) Polymérisation cationique avec SnCl₄.

Dans un tube à polymérisation sous vide, on laisse 24 h à — 30°, 2 cm³ de monomère **4** et 2,2 · 10⁻³ mole de SnCl₄ dans 10 cm³ de CH₂Cl₂. L'addition de 200 cm³ de méthanol ne provoque pas de précipité. Le spectre RMN du produit obtenu après évaporation des solvants indique que le monomère n'a pas réagi.

c) Polymérisation de Ziegler-Natta.

Dans un tube à polymérisation sous vide, on laisse 20 h à 80°, 2 cm³ de monomère **4**, 0,24 cm³ (2,2 · 10⁻³ mole) de SnCl₄ et 0,30 cm³ (2,2 · 10⁻³ mole) de Et₃Al dans 20 cm³ d'hexane. Il y a formation d'un précipité blanc en lamelles, mélangé aux restes noircis du catalyseur. Malgré plusieurs lavages, il est impossible de séparer le polymère forme des résidus. Le polymère est insoluble dans tous les solvants usuels et n'a pu être purifié.

d) Polymérisation radicalaire avec le peroxyde de benzoyle.

Dans un ballon de 50 cm³, on introduit 20 cm³ de benzène pur, 2 g de méthacrylate de chloro-4 n-butyle **4** et 0,02 g de peroxyde de benzoyle. On laisse 24 h au reflux du benzène. Le mélange est versé dans 100 cm³ de méthanol qui précipite le polymère. Celui-ci est dissous dans 20 cm³ de benzène puis reprecipité de la même façon. Après séchage dans un dessiccateur sous pression réduite, on obtient 1,3 g (65 %) de polyméthacrylate de chloro-4 n-butyle **6** (solide blanc).

Analyse (C₁₂H₁₇ClO₂)_n Calc. % : C 54,4 H 7,4 Cl 20,0
Tr. : 54,09 7,21 19,60
54,60 7,23 19,58.

M_n = 14 000

Spectre IR (cm⁻¹): $\nu_{(C=O)}$ 1 715 (FF); on n'observe rien aux environs de 1 600 cm⁻¹ (pas de double liaison).

Spectre RMN (CDCl₃) (ppm): δ 4,05 (massif) (aire 2) (—O—CH₂—); δ 3,45 (massif) (aire 2) (—CH₂Cl); δ 2,25 (massif) (aire 2) (—CH₂— de la chaîne macromoléculaire); un massif culminant à δ 1,75 (aire 7) (—CH₃ et méthylènes en 2 et 3 sur la chaîne butyle).

En mettant 2 % de peroxyde de benzoyle au lieu de 1 %, on obtient un rendement moindre (40 %) et une masse moléculaire plus faible (M_n = 13 000).

e) Polymérisation radicalaire avec l'azobisisobutyronitrile (AIBN).

Le mode opératoire utilisé est identique au précédent. Les résultats suivants ont été obtenus:

Monomère g	Benzène cm ³	AIBN %	Taux de conversion %	M _n
2	20	1	75	32 000
2	20	2	60	34 000
3	30	1	66	16 000
6	40	0,5	70	45 000
2	15	1	75	48 000

Les deux derniers essais sont les plus intéressants car ils donnent un bon rendement et une masse moyenne Mn élevée. Dans l'avant-dernier cas, on peut obtenir des quantités importantes de polymère. En recueillant uniquement ce qui précipite au méthanol en 5 mn, on effectue un fractionnement partiel de ce polymère, ce qui permet d'isoler des molécules de masse moyenne $M_n = 60\,000$, par élimination d'une grande quantité de petites molécules.

Les résultats ci-dessus montrent que le taux de conversion et la masse moyenne varient en sens inverse de la concentration en amorceur et que si le rapport $\frac{\text{monomère}}{\text{solvant}}$ augmente, la masse augmente.

Méthacrylate d'iodo-4 n-butyle 5.

Dans un ballon de 50 cm³, on introduit 3,5 g (1/50 mole) de méthacrylate de chloro-4 n-butyle 4, 10,5 g (3/50 mole) d'iodure de sodium et 20 cm³ d'acétone purifiée. On laisse 24 h au reflux de l'acétone puis on filtre le mélange. Le filtrat est traité par une solution saturée de thiosulfate de sodium pour enlever l'iode en excès, l'huile est décantée puis séchée sur sulfate de sodium. Par évaporation du reste d'acétone, puis distillation, on obtient 4,3 g (80 %) de méthacrylate d'iodo-4 n-butyle 5 pur ($E_{b,2} = 80^\circ$) sous forme de liquide incolore qui brunit sous l'action de la lumière ou de la chaleur mais peut être conservé plusieurs semaines à 0°.

Analyse C₈H₁₃IO₂:

Calc. % : C 58,82 H 7,85 I 47,38 O 11,94
Tr. : 35,61 4,81 47,34 11,81

Spectre RMN (CCl₄) (ppm) : δ 6,05 (massif) (aire 1) (H vinylique); δ 5,55 (massif) (aire 1) (H vinylique); δ 4,15 (triplet) (aire 2) ($-\text{OCH}_2-$); δ 3,25 (triplet) (aire 2) ($-\text{CH}_2\text{I}$); un massif culminant à 1,9 ppm (aire 7) ($-\text{CH}_3$ et méthylènes en 2 et 3 sur la chaîne butyle).

Le spectre RMN indique la disparition du massif à δ 3,55 ppm dû au $-\text{CH}_2\text{Cl}$ et l'apparition du massif à δ 3,25 ppm dû au $-\text{CH}_2\text{I}$.

L'utilisation d'iodure de potassium au lieu d'iodure de sodium fournit un mélange qui contient 25 % d'ester iodé 5 pour 75 % d'ester chloré 4.

Polyméthacrylate d'iodo-4 n-butyle 7.

a. Avec le peroxyde de benzoyle.

Dans un ballon de 50 cm³, on introduit 2 g de méthacrylate d'iodo-4 n-butyle 5, 0,02 g (1 %) de peroxyde de benzoyle et 20 cm³ de benzène. On laisse 24 h au reflux dans l'obscurité puis on verse le mélange dans 200 cm³ de méthanol. Le précipité obtenu est séché sous vide, redissous dans le benzène, séparé au méthanol et de nouveau séché sous vide dans un dessiccateur. On obtient 1,4 g (70 %) de polyméthacrylate de iodo-4 n-butyle 7.

Analyse (C₈H₁₃IO₂)_n: Calc. % : C 35,82 H 4,85
Tr. : 35,59 4,80.

Spectre IR (KBr) (cm⁻¹): $\nu_{\text{C=O}}$ 1 715 (FF). Plus de $\nu_{\text{C=C}}$ à 1 640.

Spectre RMN (C₆H₆) (ppm): δ 4,05 (massif) (aire 2) ($-\text{O}-\text{CH}_2-$); δ 3,0 (massif) (aire 2) ($-\text{CH}_2\text{I}$); δ 2,25 (massif) (aire 2) ($-\text{CH}_2-$ de la chaîne macromoléculaire); un massif culminant à δ 1,70 (aire 7) ($-\text{CH}_3$ et méthylènes en 2 et 3 sur la chaîne butyle).

M_n = 15 000.

En mettant 2 % d'amorceur, on obtient un rendement moindre (50 %) et une masse plus faible: $M_n = 15\,000$. Avec 0,5 % d'amorceur, le rendement est de 60 % et la masse est $M_n = 20\,000$.

b. Avec l'azobisisobutyronitrile.

On procède comme ci-dessus. En utilisant 1 % d'amorceur, le rendement est de 60 % et la masse obtenue $M_n = 30\,000$. Avec 2 %, le rendement tombe à 50 % et la masse à $M_n = 18\,000$.

Remarque: Tous ces polymères se présentent sous forme de poudre blanche que l'on peut conserver plusieurs mois à l'abri de la lumière et de l'air. Faute de suivre ces précautions, ils se colorent en brun et se réticulent rapidement par libération d'iode.

Iodation du polyméthacrylate de chloro-4 n-butyle 6.

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 60 cm³ d'acétone pure, 7 g de polymère 6 et 14 g d'iodure de sodium. On laisse 24 h au reflux de l'acétone à l'abri de la lumière. On précipite le polymère dans un bœcher contenant 200 cm³ d'une solution saturée de thiosulfate de sodium. Après agitation vigoureuse, on élimine la solution aqueuse et on effectue un second lavage avec 200 cm³ de la solution saturée de thiosulfate de sodium. Le polymère est récupéré, lave deux fois avec 200 cm³ d'eau, dissous dans 40 cm³ de benzène puis précipité dans 200 cm³ de méthanol. Après séchage sous vide, on obtient 7 g (65 %) de polyiodo-4 (solide blanc) qui doit être conservé à l'abri de la lumière et dans lequel il reste moins de 15 % de chlore pour 85 à 100 % d'iode. C'est ce que montre l'intégration du spectre RMN qui comporte un massif à δ 3,45 ppm ($-\text{CH}_2\text{Cl}$) et un massif à δ 3,0 ppm ($-\text{CH}_2\text{I}$).

$M_n = 100\,000$.

En utilisant l'iodure de potassium au lieu d'iodure de sodium, on obtient un polymère dans lequel 25 % seulement du chlore ont été remplacés par de l'iode.

Remarque: On a obtenu des polymères réticulés en diminuant le rapport benzène/monomère: au lieu de 20 cm³ de benzène pour 2 g de méthacrylate de chloro-4 n-butyle 4, on prend 30 cm³ pour 7 g. On obtient alors 7 g (100 %) de polymère réticulé (solide blanc) insoluble dans tous les solvants usuels et qui a été ensuite iodé avec NaI comme précédemment. Après séchage, on récupère un solide blanc qui se conserve bien à l'abri de la lumière dans un dessiccateur.

Copolymères de méthacrylate de méthyle et de méthacrylate de chloro-4 n-butyle 4.

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 40 cm³ de benzène pur, 2 g de méthacrylate de chloro-4 n-butyle 4, 4 g de méthacrylate de méthyle et 0,06 g d'AIBN. On laisse 24 h au reflux du benzène. Le mélange est ensuite versé dans 200 cm³ de méthanol qui précipite le copolymère. Celui-ci est dissous dans 40 cm³ de benzène puis reprécipité de la même façon pour éliminer le monomère éventuellement retenu. Après séchage dans un dessiccateur sous pression réduite, on obtient 3,6 g (60 %) de copolymère chloré (solide blanc).

Analyse: Calc. % : C 58,13 H 7,78
Tr. : 57,73 7,62
58,04 7,93.

Spectre RMN (C₆H₆) (ppm): δ 4,05 (massif) ($-\text{O}-\text{CH}_2-$); δ 3,5 (massif) ($-\text{O}-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2\text{Cl}$); δ 2,25 (massif) ($-\text{CH}_2-$ de la chaîne macromoléculaire); massif culminant à δ 1,4 ($-\text{CH}_3$ et méthylènes en 2 et 3 de la chaîne butyle).

Trois autres copolymères chlorés ont été préparés dans les mêmes conditions que ci-dessus. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant dans lequel m_1 (g) et m_2 (g) sont respectivement les masses de monomère chloré 4 et de méthacrylate de méthyle mis en œuvre. Les copolymères sont appelés copolymères 1/x en prenant $1/x = m_1/m_2$.

Copolymère (1/x)	m_1 (g)	m_2 (g)	Masse obtenue (g)	Rdt (%)	$\overline{M}_n$
1/1	3	2	2,6	60	18 000
1/2	2	4	3,6	60	46 000
1/3	1,5	4,5	4	66	43 000
1/5	1	5	4	65	43 000

L'iodation du copolymère chloré (1/1) a été effectuée de la façon habituelle en utilisant 4 g de copolymère, 8 g d'iodure de sodium et 20 cm³ d'acétone purifiée, ce qui a fourni un copolymère iodé solide et blanc (3,2 g, 63 %). Le spectre de RMN de ce produit indique que l'iodation ne dépasse pas 80 %. La masse moléculaire est $M_n = 65\,000$.

Copolymères de méthacrylate d'iodo-4 n-butyle 5 et de méthacrylate de méthyle.

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 3 g de méthacrylate d'iodo-4 n-butyle 5, 3 g de méthacrylate de méthyle, 40 cm³ de

benzène et 0,06 g (1 %) d'AIBN. On laisse 24 h au reflux du benzène et à l'abri de la lumière. Le mélange est ensuite versé dans 200 cm³ de méthanol qui précipite le copolymère. Celui-ci est dissous dans 40 cm³ de benzène puis reprecipité de la même façon pour éliminer le monomère retenu. Après séchage sous vide, on obtient 4 g (66 %) de *copoliodal-411* (solide blanc) que l'on conserve à l'abri de la lumière.

$\overline{M}_n = 73\,000$.

Spectre RMN (C_6H_6 , (ppm): δ 3,95 (massif) ($-O-CH_2-$); massif culminant à δ 3,5 ($-O-CH_3$ et $-CH_2Cl$); δ 3,0 (massif) ($-CH_2I$); δ 2,25 (massif) ($-CH_2-$ de la chaîne macromoléculaire); massif culminant à δ 1,4 ($-CH_3$ et méthylènes en 2 et 3 sur la chaîne butyle).

Le petit épaulement à δ 3,35 ppm indique que la très faible quantité de méthacrylate de chloro-4-*n*-butyle **4** présent dans l'ester iode **5** utilisé a polymérisé plus rapidement que ce dernier. (Cette hypothèse a été vérifiée par copolymérisation des deux esters **4** et **5** purs.) L'analyse indique d'ailleurs un déficit d'iode:

Calcul	C 47,9	H 6,4	I 23,6
Tr.	50,78	6,88	19,20

Trois autres *copoliodals-4* ont été préparés dans les mêmes conditions en variant les proportions des monomères de départ, la masse totale étant de 6 g. Dans le tableau suivant, le 3^e chiffre du nombre associé au mot *copoliodal* représente la masse (g) de méthacrylate de méthyle utilisée par gramme de méthacrylate d'iodo-4-*n*-butyle **5** pour la copolymérisation.

Polymère	Rdt (%)	$\overline{M}_n$
Copoliodal-412	66	66 000
Copoliodal-413	58	68 000
Copoliodal-415	58	73 000

Les analyses et les spectres RMN indiquent toujours un léger déficit en iode et la présence d'un peu de chlore, mais le taux d'iode est néanmoins supérieur à celui des copolymères iodés obtenus par iodation des copolymères chlorés correspondants ci-dessus.

Méthacrylate d'iodo-2 éthyle **10** et polymères dérivés.

a) Méthacrylate de chloro-2 éthyle **9**.

Dans un réacteur d'un litre disposé dans un bain d'eau froide et muni de deux ampoules à rétablissement de pression et d'un agitateur mécanique, on introduit une solution de 110 g de chlorure de méthacrylate dans 150 cm³ de benzène. A la solution agitée, on ajoute goutte à goutte (2 h) simultanément une solution de 110 g de triéthylamine dans 150 cm³ de benzène et une solution de 85 g de chloro-2 éthanol distillé dans 150 cm³ de benzène. On laisse réagir une nuit à température ambiante, puis on filtre deux fois pour éliminer le précipité blanc de chlorhydrate de triéthylamine. On lave le filtrat avec une solution saturée de bicarbonate de soude puis avec de l'eau alternativement (deux fois). La phase benzénique est séparée, séchée (Na_2SO_4), évaporée au rotavapor et le résidu jaune pâle purifié par distillation sous pression réduite ($E_{b,0.5} = 52^\circ$). On obtient ainsi 126 g (86 %) d'ester **9** (liquide incolore) dont le point d'ébullition est en accord avec la littérature (6).

Analyse $C_6H_9ClO_2$	Calc. %	C 48,48	H 6,06
	Tr.	48,42	5,78
		48,37	5,89

Spectre IR (cm^{-1}): $\nu_{C=O}$ 1 715 (FF); ν_{C-H} 1 640 (F).

Spectre RMN (CCl_4) (ppm): δ 6,10 (massif) (aire 1) (H vinylique); δ 5,55 (massif) (aire 1) (H vinylique); δ 4,30 (triplet) (aire 2) ($-O-CH_2-$); δ 3,70 (triplet) (aire 2) ($-CH_2Cl$); δ 1,9 (doublet) ($-CH_3$).

b) Polyméthacrylate de chloro-2 éthyle **11**.

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 40 cm³ de benzène pur, 6 g de méthacrylate de chloro-2 éthyle **9** et 0,06 g (1 %) d'AIBN. On laisse 24 h au reflux du benzène, puis le mélange est versé dans 200 cm³ de méthanol qui précipite le polymère. Celui-ci est dissous dans 40 cm³ de benzène puis reprecipité de la même façon. Après séchage sous vide, on obtient 4,5 g (75 %) de polymère (solide blanc).

Après séchage sous vide, on obtient 4,5 g (75 %) de polymère (solide blanc).

Analyse $C_6H_9ClO_2$	Calc. %	C 48,48	H 6,06
	Tr.	48,72	5,93
		48,57	5,88

$\overline{M}_n = 173\,000$.

Spectre IR (cm^{-1}): $\nu_{C=O}$ 1 715 (FF); on n'observe rien aux environs de 1 600 cm^{-1} (pas de double liaison).

Spectre RMN (C_6H_6) (ppm): δ 4,05 (massif) (aire 2) ($-O-CH_2-$); δ 3,30 (massif) (aire 2) ($-CH_2Cl$); δ 2,25 (aire 2) ($-CH_2-$ de la chaîne macromoléculaire); δ 1,40 (massif) (aire 3) ($-CH_3$).

Les rendements et les masses moléculaires sont moins élevés si on opère sur des quantités notablement plus importantes.

c) Méthacrylate d'iodo-2 éthyle **10**.

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 21 g (3/20 mole) de méthacrylate de chloro-2 éthyle **9**, 45 g (6/20 mole) d'iodure de sodium et 60 cm³ d'acétone purifiée. On laisse 48 h au reflux de l'acétone à l'abri de la lumière, puis on filtre le mélange. Le filtrat est lavé avec une solution saturée de thiosulfate de sodium pour enlever l'iode en excès. L'huile est décantée puis séchée sur sulfate de sodium. Par évaporation du reste d'acétone, puis distillation, on obtient 21 g (61 %) de méthacrylate d'iodo-2 éthyle **10** ($E_{b,0.05} = 60^\circ$) (liquide incolore que l'on peut conserver à 0° et à l'abri de la lumière).

Analyse $C_6H_9IO_2$	Calc. %	C 30,0	H 3,75
	Tr.	30,35	3,87

Spectre RMN (CCl_4) (ppm): δ 6,10 (massif) (aire 1) (H vinylique); δ 5,55 (massif) (aire 1) (H vinylique); δ 4,30 (triplet) (aire 2) ($-O-CH_2-$); δ 3,3 (triplet) (aire 2) ($-CH_2I$); δ 1,90 (doublet) (aire 3) ($-CH_3$).

d) Iodation du polyméthacrylate de chloro-2 éthyle **11**.

Dans un ballon de 50 cm³, on introduit 7 g (1/20 mole) de polymère chloré **11**, 15 g (2/20 mole) d'iodure de sodium et 40 cm³ d'acétone purifiée. On laisse 48 h au reflux de l'acétone à l'abri de la lumière. On précipite le polymère dans un bécher contenant 200 cm³ d'une solution saturée de thiosulfate de sodium. Après agitation vigoureuse, on élimine la solution aqueuse et on effectue un second lavage avec 200 cm³ de la solution saturée de thiosulfate de sodium. Le polymère est récupéré, lavé deux fois avec 200 cm³ d'eau, dissous dans 40 cm³ de benzène, puis précipité dans 200 cm³ de méthanol. Après séchage sous vide, on obtient 7 g (61 %) de polymère (solide blanc conservé à l'abri de la lumière) dans lequel plus de 80 % du chlore ont été remplacés par de l'iode, comme le montre l'intégration du spectre RMN qui comporte un massif à δ 3,30 ppm ($-CH_2Cl$) et un massif à δ 2,95 ppm ($-CH_2I$).

$\overline{M}_n = 200\,000$.

e) Polyméthacrylate d'iodo-2 éthyle (poliodal-2).

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 40 cm³ de benzène pur, 6 g de méthacrylate d'iodo-2 éthyle **10** et 0,06 g (1 %) d'AIBN. On laisse 24 h au reflux du benzène à l'abri de la lumière. Le mélange est versé dans 200 cm³ de méthanol. Le polymère précipité est dissous dans 40 cm³ de benzène puis reprecipité de la même façon. Après séchage sous vide on obtient 4,5 g (75 %) d'un solide blanc (conservé à l'abri de la lumière).

Analyse $C_6H_9IO_2$	Calc. %	C 30,0	H 3,75
	Tr.	30,46	3,93

$\overline{M}_n = 140\,000$.

Spectre RMN (C_6H_6) (ppm): δ 4,05 (massif) (aire 2) ($-O-CH_2-$); δ 2,95 (massif) (aire 2) ($-CH_2I$); δ 2,25 (massif) (aire 2) ($-CH_2-$ de la chaîne macromoléculaire); δ 1,40 (massif) (aire 3) ($-CH_3$).

Copolymères de méthacrylate d'iodo-2 éthyle **10** et de méthacrylate de méthyle.

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 3 g de méthacrylate d'iodo-2 éthyle **10**, 3 g de méthacrylate de méthyle, 40 cm³ de benzène et 0,06 g (1 %) d'AIBN. On laisse 24 h au reflux du benzène à l'abri de la lumière. Le mélange est ensuite versé dans 200 cm³ de méthanol. Le copolymère précipité est dissous dans 40 cm³ de benzène puis reprecipité de la même façon. Après séchage sous vide, il reste 4,5 g (75 %) de *Copoliodal-211* (solide blanc) qui doit être conservé à l'abri de la lumière.

Spectre RMN (C_6H_6) (ppm) : δ 3,95 (massif) ($-O-CH_2-$); δ 3,5 (massif) ($-O-CH_3$ et $-CH_2Cl$); δ 2,9 (massif) ($-CH_2I$); δ 2,25 (massif) ($-CH_2-$ de la chaîne macromoléculaire); un massif culminant à δ 1,4 ($-CH_3$).

$M_n = 73\,000$.

Trois autres copolymères ont été obtenus dans les mêmes conditions en variant les proportions des monomères de départ pour une masse totale de 6 g. Dans le tableau suivant, le 3^e chiffre du nombre associé au mot *copoliodal* représente la masse (g) de méthacrylate de méthyle utilisé par gramme de méthacrylate d'iodo-2 éthyle **10** pour la copolymérisation.

Copolymère	Rdt (%)	M_n
Copoliodal-212	75	75 000
Copoliodal-213	58	68 000
Copoliodal-215	58	73 000

Polyméthacrylate de *n*-butyle.

Dans un réacteur d'un litre disposé dans un bain d'eau froide et muni de deux ampoules à rétablissement de pression et d'un agitateur mécanique, on introduit 57 g de chlorure de méthacrylyle dans 70 cm³ de benzène. A la solution agitée, on ajoute goutte à goutte (2 h) et simultanément, d'une part une solution de 57 g de triéthylamine dans 70 cm³ de benzène, et d'autre part une solution de 42 g de *n*-butanol dans 70 cm³ de benzène. On laisse réagir une nuit à température ambiante, filtre deux fois pour éliminer le précipité blanc de chlorhydrate de triéthylamine, et lave le filtrat avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis avec de l'eau alternativement (deux fois). La phase benzenique est séparée, séchée (Na_2SO_4), évaporée au rotavapor et le résidu jaune pâle purifié par distillation sous vide ($E_{b,0.5} = 36^\circ$). On obtient ainsi 55 g de méthacrylate de *n*-butyle (liquide incolore) dont le point d'ébullition est en accord avec celui de la littérature (7).

Dans un ballon de 100 cm³, on chauffe 24 h à reflux une solution de méthacrylate de *n*-butyle (6 g) et d'AIBN (0,06 g) dans le benzène (40 cm³), puis on traite par 200 cm³ de méthanol. Le polymère précipité est dissous dans 40 cm³ de benzène puis reprécipité au méthanol. Après séchage sous vide, on obtient 3 g (50 %) d'un polymère solide blanc déjà décrit (8).

$M_n = 81\,000$.

Analyse ($C_8H_{14}O_2$)_n: Calc. % : C 67,60 H 9,85
Tr. : 67,41 9,97.

Spectre RMN (C_6H_6) (ppm) : δ 4,05 (massif) (aire 2) ($-O-CH_2-$); δ 2,25 (massif) (aire 2) ($-CH_2-$ de la chaîne macromoléculaire); un massif culminant à δ 1,55 (aire 7) ($-CH_3$ méthacrylique et méthylènes en 2 et 3 sur la chaîne butyle); δ 0,95 (aire 3) ($-CH_3$ de la chaîne butyle).

Un polyméthacrylate de méthyle a été préparé de la même façon, à partir du monomère du commerce, avec $M_n = 43\,000$.

Transformations chimiques du polyméthacrylate de chloro-2 éthyle **11**.

a) Hydrolyse acide du polyméthacrylate de chloro-2 éthyle **11**.

Dans un bēcher de 50 cm³ on introduit 20 cm³ de H_2SO_4 à 95 % et 1 g de polymère **11** finement broyé (13). On agite pour obtenir une suspension homogène, laisse 24 h à température ambiante, puis on verse le mélange dans 200 cm³ d'eau. Le polyacide précipité est filtré sur verre fritté n° 2 (Prolabo) puis lavé plusieurs fois à l'eau distillée glacée. On obtient, après séchage sous vide, 0,6 g (60 %) de polyacide méthacrylique (PAMA) (solide blanc).

b) Estérification du polyacide formé.

Dans un bēcher de 25 cm³ on introduit 0,3 g du polyacide ci-dessus et 20 cm³ de tétrahydrofurane (THF). On verse alors 5 cm³ d'éther contenant environ 0,5 g de diazométhane préparé selon la littérature (32). On laisse réagir pendant 3 h, puis on détruit l'excès de diazométhane par addition de 10 cm³ d'acide acétique N (14). On verse alors le mélange dans 200 cm³ de méthanol. Le polyester précipité est dissous dans 10 cm³ de benzène et reprécipité comme ci-dessus. Après séchage sous vide, on obtient 0,3 g (100 %) de polyméthacrylate de méthyle (PMAM) (solide blanc).

c) Réduction du polyméthacrylate de chloro-2 éthyle **11**.

Dans un ballon de 100 cm³ on introduit 20 cm³ de THF purifié, 5 cm³ de benzène anhydre et 1 g de polyester **11**. On ajoute ensuite lentement une suspension de 1 g de $LiAlH_4$ dans 20 cm³ de THF, laisse 4 h au reflux (15), puis refroidit dans la glace. Après avoir ajouté avec précaution 20 g de glace pilée, on filtre sur papier, lave le précipité à l'eau glacée, puis on le dissout dans 20 cm³ de *m*-crésol et on filtre à chaud sur buchner. Le filtrat est versé dans 200 cm³ d'acétone, le polyalcool précipité est ensuite filtré sur verre fritté et lavé plusieurs fois à l'acétone. Après séchage sous vide on obtient 0,4 g (80 %) de polyalcool (solide blanc).

Remarque: Le polyméthacrylate de *n*-butyle, le poliodal-4 et le Copoliodal-413 ont été traités de la même façon que le polyméthacrylate de chloro-2 éthyle **11** et ont conduit aux mêmes résultats.

Tacticités comparées du polyester **11**, du PAMA, du PMAM et du polyalcool correspondants.

La tacticité des polymères a été déterminée par intégration des aires des signaux correspondants en RMN aux $-CH_3$ en α des groupements carboxyliques et situés dans des enchaînements syndiotactiques (S), isotactiques (I) ou hétérotactiques (H). Le spectrographe utilisé était un Jeol Minimar 100 opérant à 100 MHz (échelle δ de 0 à 5 ppm).

Résultats obtenus :

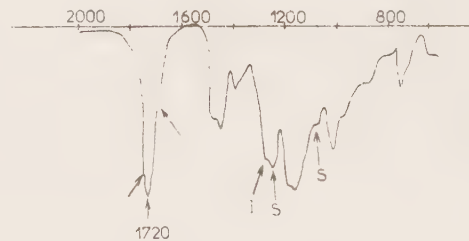
Polymère	Enchaînements (%)		
	I	H	S
Polyester 11	11	37	52
PAMA	9	41	50
PMAM	10	40	50
Polyalcool	13	40	47

Ces résultats doivent être considérés comme identiques, compte tenu des erreurs commises dans la mesure des aires des pics.

Remarque: Les différents pics correspondant aux $-CH_2-$ en position β des groupements carboxyliques montrent également l'existence des trois types d'enchaînements.

Spectres RMN (100 MHz) (δ 0 à 5 ppm) (voir les figures de la page suivante).

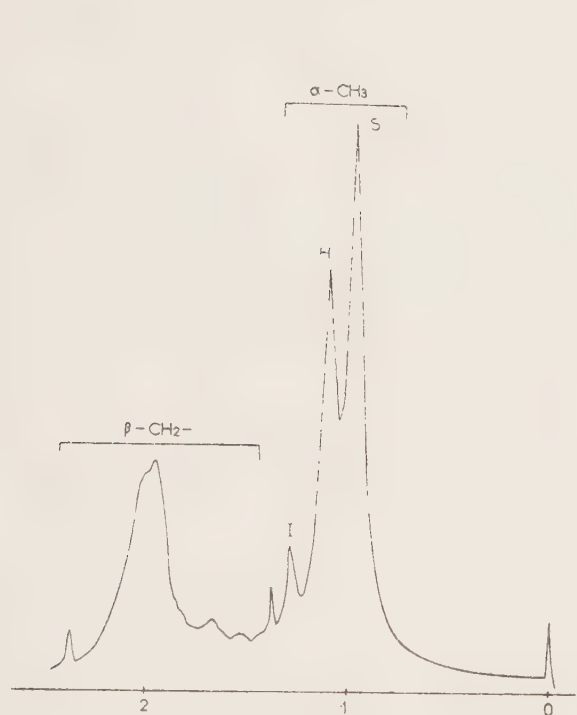
Spectre IR du poliodal-4 (KBr).



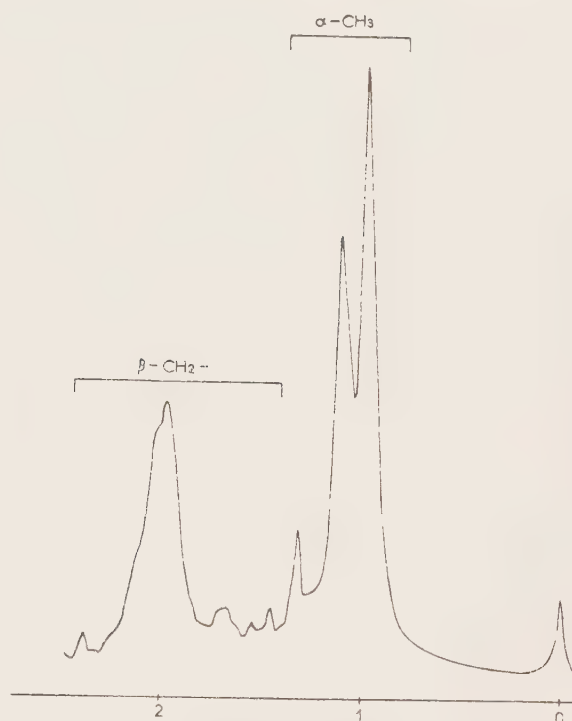
Ce spectre met en évidence la présence des trois enchaînements possibles; on trouve, en effet, trois valeurs pour $\nu_{C=O}$, les deux pics pour $C-O-C$ avec D_{1236}/D_{1255} inférieur à 1 (prédominance syndiotactique), et l'épaule à $1\,060\,cm^{-1}$ (enchaînement syndiotactique).

Courbes de distribution des masses.

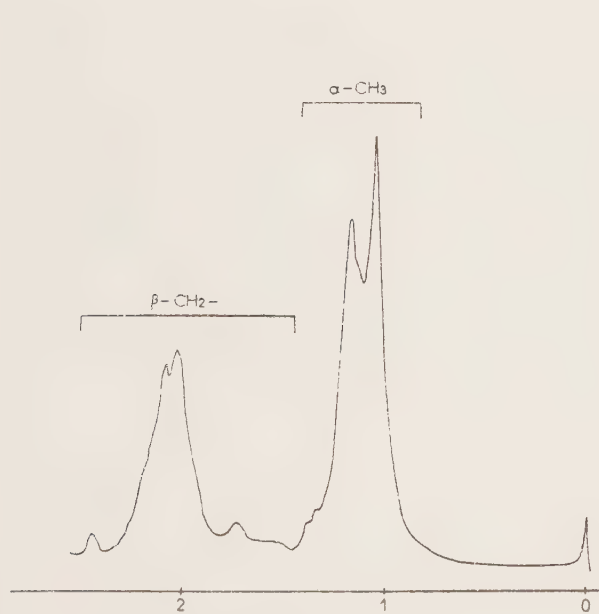
Ces courbes ont été obtenues avec un chromatographe de gel (GPC) Waters-Associates, en utilisant des solutions à 0,30 % de polymère dans le benzène; la colonne utilisée avait été étalonnée avec du polystyrène pour des molécules de masses de 5 000 à 1 000 000.



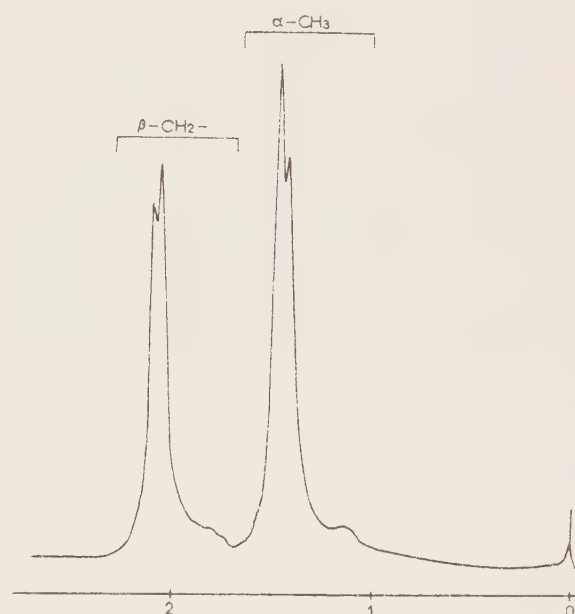
Polyester 11 (DMSO-*d*₆, 100°).



PMAM (DMSO-*d*₆, 100°).



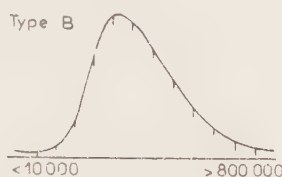
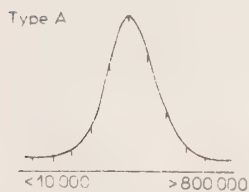
PAMA (DMSO-*d*₆, 100°).



Poyalcol (pyridine, 100°).

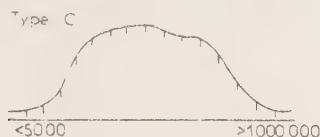
On observe trois types de courbes :

BIBLIOGRAPHIE.



Courbe A en cloche symétrique pour les copolymères chlorés, les *copoliiodals-2*, les *copoliiodals-4* ainsi que pour les homopolymères dérivés du méthacrylate de méthyle et du méthacrylate de *n*-butyle.

Courbe B en cloche dissymétrique pour les homopolyméthacrylates de chloro-4 *n*-butyle et de chloro-2 éthyle (**6** et **11**).



Courbe C à palier pratiquement horizontal pour les *poliiodal-4* et *poliiodal-2*.

Les résultats obtenus sont rassemblés ci-après :

Polyméthacrylates	$\bar{M}_n$	Degré de polymérisation moyen	Distribution des masses (courbe de)	Tacticité (%)		
				I	H	S
Chloro-4 <i>n</i> -butyle	60 000	340	type B	16	41	43
Poliiodal-4	100 000	370	type C	14	40	46
Copoliiodal-411	73 000	520	type A	10	40	50
Copoliiodal-412	66 000	530	type A	12	38	50
Copoliiodal-413	68 000	580	type A	8	42	50
Copoliiodal-415	73 000	650	type A	10	40	50
Chloro-2 éthyle	173 000	1 150	type B	11	37	52
Poliiodal-2	200 000	830	type C	12	35	53
Copoliiodal-211	73 000	520	type A	11	36	53
Copoliiodal-212	75 000	600	type A	10	38	52
Copoliiodal-213	68 000	580	type A	12	40	48
Copoliiodal-215	73 000	660	type A	12	42	46
<i>n</i> -butyle	81 000	570	type A	15	35	50
Méthyle	43 000	430	type A	15	35	50

- (1) H. WALKER et K. E. WEALE, *J. chem. Soc.*, 1955, 2295.
- (2) A. ORSZACH et H. CZARNODOLA, *Nukleonika Tom X*, 1965, 177; *Chem. Abstr.*, 1966, **63**, 14 987 e.
- (3) M. A. ASKAROV et S. P. PINKHASOV, *Osbeksk. Khim. Zh.* 1964, **8** (6), 45; *Chem. Abstr.*, 1965, **62**, 10 522 d.
- (4) A. I. VOLKOVA et M. M. KOTON, *Vysokomolekul. Soedin.* 1964, **6** (3), 480; *Chem. Abstr.*, 1964, **61**, 14 785 c.
- (5) G. MANECKE et H. J. FORSTER, *Makromol. Chem.*, 1966, **91**, 136.
- (6) M. A. ASKAROV et S. P. PINKHASOV, *Khim. i Fiz.-Khim. Prirodn. Sintetich. Polimerov, Akad. Nauk Uz. SSR, Ins. Khim. Polimerov* N° 2, 1964, 142; *Chem. Abstr.*, 1964, **61**, 13 181 e.
- (7) J. W. C. CRAWFORD, *Brevet US* n° 2 056 771 (1936); *Chem. Abstr.*, 1936, **30**, 8247.
- (8) I. MONORU, O. TAKEYUKI et O. TADATOSHI, *Kobunshi Kagaku*, 1957, **15**, 181; *Chem. Abstr.*, 1960, **54**, 954 f.
- (9) F. A. BOVEY et G. V. D. TIERS, *J. Polymer Sci.*, 1960, **44**, 173.
- (10) Y. KATO et A. NISHIOKA, *J. Polymer Sci.*, 1965, B 3, 739.
- (11) F. A. BOVEY, *Pure Appl. Chem.*, 1966, **12**, 525.
- (12) K. HATADA, K. OTA et H. YUKI, *J. Polymer Sci.*, 1967, **5** (B 3), 225.
- (13) E. KLESNER, *J. Polymer Sci.*, 1968, **6** (B 4), 313.
- (14) A. KATCHELSKI et H. EISENBERG, *J. Polymer Sci.*, 1951, **6**, 145.
- (15) R. C. SCHULZ et P. ELZER, *Makromol. Chem.*, 1960, **42**, 205.
- (16) W. M. RITCHEY et F. J. KNOLL, *J. Polymer Sci.*, 1966, **4** (B 11), 853.
- (17) M. NAGAI et A. NISHIOKA, *J. Polymer Sci.*, 1968, **6** (A 1), 1655.
- (18) K. MATSUZAKI, T. URYU et K. ITO, *Makromol. Chem.*, 1969, **126**, 292.
- (19) T. FUJIMOTO, N. KAWABATA et J. FURUKAWA, *J. Polymer Sci.*, 1968, **5** (A 1), 1209.
- (20) H. YUKI et K. OHTA, *J. Polymer Sci.*, 1968, **6** (A 1), 829.
- (21) W. M. LEE, B. R. MCGARVEY et F. R. EIRICH, *A.C.S. Polymer Preprints*, 1967, **8** (1), 1602.
- (22) D. STARR et R. M. HIXON, *J. amer. chem. Soc.*, 1934, **56**, 1595.
- (23) G. M. BENNETT et F. HEATHCOAT, *J. chem. Soc.*, 1929, 268.
- (24) W. R. KIRNER et G. H. RICHTER, *J. amer. chem. Soc.*, 1929, **51**, 2503.
- (25) M. D. BARNETT, A. CRAWSHAW et G. B. BUTLER, *J. amer. chem. Soc.*, 1959, **81**, 5947.
- (26) R. E. LUTZ, *J. amer. chem. Soc.*, 1930, **52**, 3423.
- (27) J. M. RIVOALEN, *C.R. Acad. Sci.*, 1964, **258**, 6425.
- (28) R. C. SCHULZ, P. ELZER et W. KERN, *Chimia (Suisse)*, 1959, **13**, 235.
- (29) I. A. ARBUZOVA, L. I. MEDVEDEVA et S. A. PLOTKINA, *Zh. obshch. Khim.*, 1956, **26**, 1427; *Chem. Abstr.*, 1956, **50**, 16 694 f.
- (30) J. HEYBOER et A. J. STAVERMAN, *Rec. Trav. Chim.*, 1950, **69**, 791.
- (31) H. KAMMERER, A. JUNG et J. S. SHUKLA, *Makromol. Chem.*, 1967, **107**, 259.
- (32) A. I. VOGEL, *Practical Organic Chemistry*, Longman, London, 1957, p. 969.

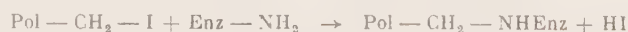
N° 735. — Enzymes insolubilisées.

II. — Préparations et propriétés de dérivés insolubles de l'uréase et de la trypsine (*),

par Éric BROWN et André RACOIS.

(Laboratoire de synthèse organique, Faculté des Sciences, 72-Le Mans.)

(Manuscrit reçu le 8.6.71.)

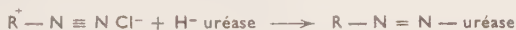
L'uréase $\text{Enz} - \text{NH}_2$ réagit sur le *Poliodal-4* $\text{Pol} - \text{CH}_2 - \text{I}$ (polyméthacrylate d'iodo-4 *n*-butyle) selon le schéma probable :

Après réticulation au moyen d'éthylènediamine du produit de réaction colloïdal obtenu, on isole des dérivés uréase/polymère insolubles dans l'eau et biologiquement actifs. L'activité enzymatique résiduelle de ces dérivés peut atteindre 70 % de celle de l'enzyme initiale. Ils présentent une activité maximale à pH 7, comme l'uréase pure. Des dérivés insolubles de la trypsine ont été préparés de la même façon, la réticulation au moyen d'éthylènediamine s'avérant ici inutile. L'activité résiduelle de ces dérivés est environ 30 % de celle de la trypsine initiale utilisée.

1. — Introduction.

A. — Dérivés insolubles de l'uréase.

Un certain nombre de combinaisons insolubles uréase/support macromoléculaire sont actuellement connues (1 à 4). Dans la plupart des cas, le support macromoléculaire possède des groupements diazoïques (1 à 3) qui réagissent sur les cycles phénoliques de la tyrosine contenue dans l'enzyme pour donner des combinaisons insolubles uréase/support, selon la réaction suivante :



Ces dérivés insolubles contiennent de 15 à 60 mg d'enzyme pour 100 mg de support et l'activité enzymatique résiduelle est la moitié de celle de l'uréase initiale (1).

L'uréase a également été *enfermée* dans de petites capsules semiperméables de polystyrène, d'éthylcellulose ou de silicones. L'activité résiduelle des dérivés est environ le sixième de celle de l'uréase initiale utilisée (4). On a souligné récemment l'intérêt que pouvait présenter une uréase insolubilisée, notamment dans la construction des reins artificiels (5) et dans le dosage en continu de l'urée (1).

B. — Dérivés insolubles de la trypsine.

Parallèlement, diverses combinaisons insolubles trypsine/support macromoléculaire ont été également décrites dans la littérature (6 à 18). Nous allons indiquer rapidement ci-après les diverses techniques d'insolubilisation qui ont été utilisées pour préparer ces combinaisons :

a) méthode par « précipitation » :

Par copolymérisation avec la tyrosine, la trypsine fournit une polytyrosyltrypsine insoluble. Le dérivé obtenu par cette technique hardie et ingénieuse contient en poids de 3 à 29 % d'enzyme dont l'activité résiduelle varie de 0 à 28 % de celle de la trypsine de départ (6).

b) méthode par « insertion » dans une résine (7) ou dans un gel polyamide, l'activité catalytique résiduelle étant de 10 % environ dans ce dernier cas (8, 9).

(*) Notes préliminaires : E. BROWN, A. RACOIS et H. GUENIFFEY, *Tetrahedron Letters*, 1970, (25), 2139; et E. BROWN et A. RACOIS, *Tetrahedron Letters*, 1971, (15), 1047.

Mémoire précédent : E. BROWN, A. RACOIS et H. GUENIFFEY, *Bull. Soc. chim. Fr.*, 1971, p. 4341.

c) méthode par pontage :

L'enzyme est fixée sur un polymère réactif par l'intermédiaire d'un agent de réticulation bifonctionnel tel que la trichloro-2,4,6-s-triazine (10). La trypsine a également été fixée récemment sur du verre poreux par pontage avec du γ -aminopropyltriéthoxysilane (11) que l'on peut également transformer en groupement isothiocyanate pour augmenter la réactivité.

d) méthode par fixation sur un polymère au moyen de liaisons covalentes :

Le polymère utilisé possède des groupements fonctionnels réactifs qui sont amenés à réagir sur les groupements aminés libres de l'enzyme (tels que les $-\text{NH}_2$ en position ϵ de la lysine).

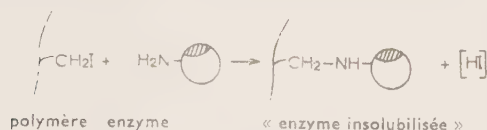
Ainsi la trypsine a pu être liée à des copolymères de L-alanine et d'acide L-glutamique au moyen du réactif de Woodward (le N-éthylphényl-5-isoxazolium sulfonate-3' ou réactif K), avec un taux de fixation de 73 % et une activité résiduelle de 43 % (12). Par réaction avec un polyazoture d'acyle, la trypsine conduit à un dérivé insoluble dont l'activité résiduelle est de 40 % (13). Le dérivé obtenu avec un polyanhydride d'acide présente une activité résiduelle de 65 % environ (14, 15). Outre ces types de polymères, on a utilisé également avec un certain succès des polyisothiocyanates (16) et surtout des supports comportant des groupements diazonium qui donnent lieu à une fixation importante d'enzyme. Dans ce dernier cas, l'activité trypsine des combinaisons insolubles obtenues est très variable, mais généralement inférieure à 40 % de l'activité de la trypsine originelle (17 à 19).

Sur le plan pratique, une trypsine insolubilisée pourrait être utilisée avec profit dans l'industrie alimentaire, et tout particulièrement pour augmenter la durée de conservation du lait (5).

2. — Le présent travail.

Dans le but de préparer d'autres types d'enzymes insolubilisées, nous nous sommes proposés d'utiliser des supports macromoléculaires différents de ceux utilisés jusqu'à présent et dont nous avons déjà indiqué les préparations. Ces polymères sont, d'une manière générale, des polyméthacrylates d' ω -iodo *n*-alcyle : ils comportent par conséquent des chaînes latérales linéaires se terminant par des groupements $-(\text{CH}_2)_n\text{I}$. A notre connaissance, ce type de groupement fonctionnel n'a jamais

été utilisé pour lier une enzyme à un polymère. En ce qui nous concerne, la réaction de fixation se ramène à l'alcoylation d'une amine primaire (enzyme) par un iodure d'alcoyle (polymère), selon le schéma probable :



Du fait de la grande fragilité et des propriétés particulières des enzymes, leur greffage sur les polymères doit en principe être effectué à froid et en milieu aqueux tamponné (20 à 22). Il n'était pas évident *a priori* que dans des conditions aussi douces, le groupement iodure d'alcoyle soit suffisamment réactif pour permettre la fixation de l'enzyme. A ce sujet, il convient de noter que le choix du polymère de fixation est plus difficile dans le cas d'un enzyme que dans le cas d'un antigène. En effet, ce dernier présente de nombreux sites actifs, tandis qu'une molécule d'enzyme n'en comporte qu'un petit nombre, souvent même un seul, et toute modification chimique de ces sites actifs (par alcoylation, etc...) entraîne presque invariablement leur totale désactivation (20).

A titre de réactions modèles, nous avons donc effectué le greffage d'amines primaires (benzylamine, éthylènediamine) puis d'acides aminés simples (alanine) sur les *Poliodals-4* de grande masse. Les résultats obtenus étant satisfaisants (l'analyse centésimale indiquait une nette diminution du pourcentage d'iode sur le support macromoléculaire après réaction), nous avons ensuite procédé au greffage de l'uréase puis de la trypsine sur les différents polymères iodés préparés.

A. — Préparation d'uréase insolubilisée.

Nous avons fait réagir l'uréase sur le *Poliodal-4*, soit en solution tampon phosphate (Na_2HPO_4) à pH = 8,8, soit dans le dioxanne purifié. Nous avons pu constater que la combinaison enzyme/support était obtenue sous forme partiellement colloïdale, sans doute parce que la masse moléculaire de l'uréase initiale est très élevée ($M = 480\,000$) (32) vis-à-vis de celle du support macromoléculaire insoluble ($M_n \approx 100\,000$). Heureusement, nous avons pu réaliser l'insolubilisation totale de cette combinaison par adjonction au milieu réactionnel de benzylamine ou d'éthylènediamine qui ont réagi sur les groupements $\text{---CH}_2\text{I}$ encore libres, entraînant ainsi une réticulation supplémentaire de l'édifice macromoléculaire. Lors de l'addition de ces bases organiques, nous avons dû veiller à ce que le pH du milieu reste inférieur à 9, afin d'éviter une diminution trop prononcée de l'activité de l'uréase non fixée et présente dans les filtrats. Après addition d'amine, le dérivé insoluble obtenu a été filtré puis lavé à l'eau jusqu'à ce que le dernier filtrat ne présente plus d'activité enzymatique décelable.

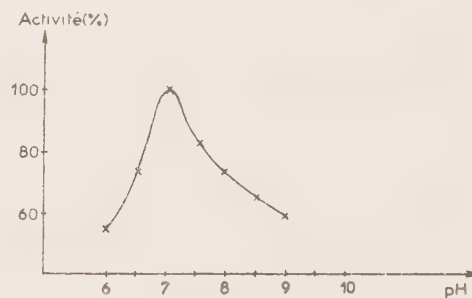
Mesure de l'activité des combinaisons insolubles uréase-support.

L'activité de ces dérivés insolubles de l'uréase a été mesurée par dosage colorimétrique du carbonate d'ammonium formé par hydrolyse enzymatique de l'urée. Le mode opératoire que nous avons utilisé était invariablement le suivant : on agite pendant 5 mn une suspension du dérivé insoluble uréase-support dans une solution tamponnée d'urée, puis on élimine le polymère par filtration. Après traitement de la solution claire par du réactif de Nessler, on note l'absorption du mélange jaune obtenu à la longueur d'onde de 490 nm (spectrophotomètre Beckmann) (23).

Une courbe d'étalonnage de l'activité enzymatique en

fonction de sa masse a été tracée (voir partie expérimentale) pour l'uréase initiale dans des conditions opératoires identiques à celles utilisées pour ses dérivés insolubles, ce qui a permis de calculer la masse m_1 d'uréase pure ayant la même activité que le dérivé insoluble. La masse m_2 d'uréase non fixée sur le polymère et présente dans les filtrats a été déterminée par incubation avec une solution d'urée dans les mêmes conditions que l'uréase pure. Pour calculer m_2 , nous avons admis que l'uréase des filtrats avait conservé son activité originelle. La masse m_2 d'uréase fixée sur le polymère est donnée par la différence $m_3 = m_0 - m_2$, m_0 représentant la quantité d'uréase mise en présence du polymère en vue du greffage. L'activité relative r du dérivé uréase-support vis-à-vis de l'uréase de départ est donnée par le rapport $r = m_1/m_3$. Les masses m_0 d'uréase utilisée pour la fixation étaient de 50 mg par gramme de polymère. Dans ces conditions les quantités d'enzyme fixée sont de l'ordre de 10 à 15 mg par gramme de polymère iodé initial, l'activité enzymatique résiduelle variant suivant les cas de 25 à 75 % de l'activité originelle. Cette grande variation d'activité observée au cours d'essais souvent analogues indique que l'insolubilisation de l'uréase n'est pas un phénomène très reproductible en ce qui nous concerne, ce qui n'est guère étonnant compte tenu du grand nombre de facteurs en présence et notamment de l'homogénéité toute relative de l'enzyme et des supports utilisés. Ces combinaisons uréase-support semblent néanmoins assez stables puisque dans plusieurs cas étudiés leur activité n'avait pas varié plus de deux mois après leurs préparations.

Nous avons mesuré l'activité d'une combinaison uréase-support en fonction du pH, ce qui a conduit à tracer une courbe en cloche indiquant une activité maximale à pH = 7, comme pour l'uréase pure (24).



L'examen de cette courbe montre qu'à pH = 8,8, l'uréase insolubilisée ne présente plus que 60 % de son activité maximale.

La dénaturation relativement importante de l'uréase insolubilisée peut être due à une réaction non spécifique des groupements $\text{---CH}_2\text{I}$ avec les groupements ---NH_2 libres de l'enzyme. On sait en effet que l'acide iodacétique alcoyle les groupements ---NH_2 libres des enzymes mais également les groupements thiols, sulfures, l'hydroxyle phénolique de la tyrosine et le cycle imidazole de l'histidine (25, 26).

B. — Préparation de trypsine insolubilisée.

Afin de préparer d'autres types de trypsine « insoluble » nous avons utilisé les divers polymères hydrophiles décrits précédemment, notamment le *Poliodal-4* et quatre copolymères statistiques, les *Copiodals-411*, *412*, *413* et *415*.

Le greffage de trypsine lyophilisée sur ces polymères a été réalisé en solution tampon phosphate à pH = 7,2 pendant 24 heures à 2°, en prenant 50 mg d'enzyme pour 1 g de polymère. Contrairement à ce que nous avions observé dans le cas de l'uréase, nous avons obtenu direc-

tement un dérivé insoluble facilement récupérable par filtration. Ce solide a été lavé à l'eau distillée en plusieurs fois (80 cm³ au total) jusqu'à ce que la dernière eau de lavage ne présente plus d'activité enzymatique appréciable.

L'activité trypsique des dérivés insolubles a été mesurée à pH = 7,8 par titrage à la soude de l'acide libéré par hydrolyse enzymatique d'un substrat de la trypsine, le chlorhydrate de N-benzoyl-L-arginine méthyl ester (19, 27). Une courbe donnant la masse de substrat hydrolysé en 10 mn, en fonction de la masse de trypsine, a permis de calculer, de la même façon que pour l'uréase, la masse d'enzyme fixée sur le polymère et l'activité relative du dérivé insoluble par rapport à la trypsine originelle. Là encore, nous avons calculé la quantité d'enzyme fixée par la différence entre la masse totale mise en œuvre (soit 50 mg) et la masse non fixée présente dans les filtrats. Cette masse d'enzyme non fixée a été évaluée par mesure de l'activité trypsique du filtrat, ce qui est légitime puisque nous avons pu vérifier sur des solutions-témoins que les conditions de la réaction de greffage (24 h, 20°, pH = 7,2), n'entraînaient aucune dénaturation appréciable de la trypsine de départ.

Un dosage par spectrophotométrie UV de la trypsine non fixée et présente dans les filtrats a fourni des résultats proches de ceux obtenus par la méthode ci-dessus.

Nous avons constaté que, pour un même support macromoléculaire, la masse d'enzyme fixée est plus importante dans le cas de la trypsine que dans le cas de l'uréase. La masse de trypsine fixée varie de 26 à 36 mg par gramme de polymère et croît comme le nombre de groupements réactifs —CH₂I présents dans le polymère. L'activité résiduelle des différents dérivés insolubles obtenus varie de 26 à 31 % de celle de la trypsine de départ : la reproductibilité des expériences est donc ici meilleure que dans le cas de l'uréase. Après conservation dans l'acide chlorhydrique 0,0025 N pendant 3 mois, les dérivés préparés ne présentaient plus que 10 % de leur activité initiale, alors que dans les mêmes conditions, Katchalski avait observé que ses dérivés insolubles de la trypsine conservaient encore 65 % de leur activité originelle (19). De toute façon, il semble bien établi que les dérivés insolubles des enzymes sont beaucoup plus stables à l'état lyophilisé qu'en suspension (28). D'autre part des mesures d'activité, effectuées à divers pH tant pour la trypsine pure que pour ses dérivés insolubles, ont montré que pour des pH supérieurs à 8 les dérivés insolubles présentaient une activité notablement plus importante que la trypsine pure dans les mêmes conditions.

Afin de déterminer la quantité approximative de trypsine fixée sur le support par simple physisorption (29, 30), nous avons fait incuber dans les conditions habituelles une solution tamponnée de 50 mg de trypsine en présence de 1 g d'un polymère dépourvu de groupements fonctionnels réactifs, le polyméthacrylate de *n*-butyle. Ce polymère déjà décrit a été préparé de la même façon que les *Poliiodals-4*, afin qu'il ait une tacticité et un degré de polymérisation comparables. Nous avons ainsi observé que 10 % de la trypsine initiale restaient assez fortement adsorbés sur ce polymère non réactif et que ni l'enzyme physisorbée, ni le polymère présente dans les filtrats, n'avaient été dénaturées de façon sensible au cours de l'opération. Ce dernier résultat justifie lui aussi nos calculs précédents de la masse d'enzyme fixée sur les *Poliiodals-4* par la différence entre la masse mise en œuvre (50 mg) et la masse d'enzyme non fixée (déterminée par mesure de l'activité des filtrats).

3. — Conclusion.

La fixation sur des *Poliiodals-4* et *Copolyiodals-4* de la trypsine par ses groupements basiques réactifs peut être effectuée comme pour l'uréase et fournit des dérivés

insolubles dans l'eau. Dans le cas de l'uréase, nous avons constaté que les combinaisons polymère/enzyme obtenues étaient partiellement colloïdales du fait que la masse moléculaire de l'uréase ($M = 480\,000$) est très supérieure à celle du polymère ($M_n = 100\,000$) et ces combinaisons ont dû être insolubilisées par réticulation au moyen d'éthylènediamine. Avec la trypsine, qui a une masse moléculaire nettement plus faible ($M \approx 25\,000$) (31, 32), les dérivés obtenus sont très insolubles et leur réticulation est donc inutile. La quantité de trypsine fixée paraît dépendre assez peu du nombre de groupements iodures d'alcoyle présents dans les différents copolymères statistiques utilisés, ce qui est intéressant sur le plan économique. Nous constatons que le taux de fixation de la trypsine sur les polymères est nettement plus élevé que pour l'uréase. Par contre, après fixation, l'uréase s'avère souvent moins désactivée que la trypsine dans les mêmes conditions.

Une fraction non négligeable d'enzyme fixée semble l'être par simple physisorption, ce qui exige des lavages importants et répétés du dérivé insoluble si on désire que l'activité de ce dernier reste constante au cours de son utilisation dans des réactions enzymatiques ultérieures. Enfin, la comparaison des présents résultats avec ceux indiqués dans la littérature (et que nous avons rappelés brièvement au début de cet exposé) montre que les dérivés insolubles de l'uréase et de la trypsine, obtenus à partir des *Poliiodals-4*, présentent des propriétés analogues à celles de la plupart des dérivés correspondants préparés par d'autres auteurs selon des méthodes différentes.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

1. — Préparation et propriétés de dérivés insolubles de l'uréase.

Fixation de benzylamine et d'alanine sur le polyméthacrylate d'iodo-4 n-butyle (poliiodal-4).

Dans une fiole conique de 25 cm³, on agite magnétiquement pendant 1 h une suspension de 1 g de *poliiodal-4* dans 15 cm³ d'une solution tampon de HNa₂PO₄ à 18 ‰ (pH = 8,8). On ajoute quelques gouttes de benzylamine. Après 15 mn de réaction on isole un produit solide très dur insoluble dans tous les solvants usuels.

L'analyse obtenue pour l'azote (N = 3,90 %, pour un maximum de 6 %) indique qu'une bonne quantité d'amine s'est fixée par substitution de l'iode en formant des réticulations qui rendent le polymère insoluble.

Dans les mêmes conditions que précédemment, on laisse 24 h sous agitation 50 mg d'alanine et 1 g de *poliiodal-4* dans 15 cm³ de solution HNa₂PO₄ à 18 ‰. Le dérivé insoluble récupéré est lavé puis séché. Une analyse indique que le pourcentage de carbone est passé de 38 à 42 %, ce qui montre une fixation notable d'alanine sur le polymère.

Fixation de l'uréase sur le polyméthacrylate d'iodo-4 n-butyle (poliiodal-4).

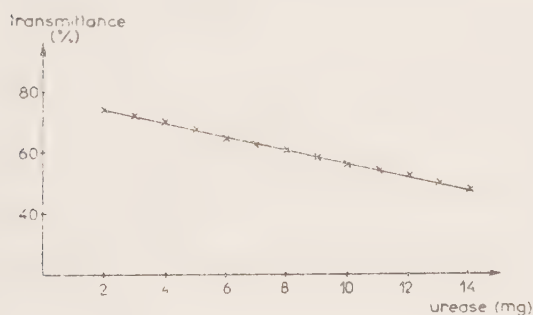
L'uréase de Merck utilisée avait une activité de 250 000 U/g (33). Dans une fiole conique de 25 cm³, on agite magnétiquement à 20, 30 ou 40°, pendant 24, 48 ou 72 h, une suspension de 1 g de *poliiodal-4* et de 50 mg d'uréase dans 15 cm³ d'une solution tampon de HNa₂PO₄ à 18 ‰ (pH = 8,8).

À la fin de la réaction, on substitue l'halogène restant par addition lente de quelques gouttes de benzylamine ou mieux d'éthylènediamine concentrée ou diluée dans 5 cm³ d'eau, ce qui entraîne une précipitation totale de la combinaison enzyme/support. Après addition de 35 cm³ de la solution tampon, les dérivés insolubles obtenus sont séparés par centrifugation puis lavés plusieurs fois sur verre fritté avec de la solution tampon jusqu'à ce que le dernier filtrat ne présente plus d'activité enzymatique (volume

total obtenu : 100 cm³). Le dérivé insoluble est alors conservé au dessiccateur et le filtrat à température ambiante. Des réactions identiques ont été réalisées en remplaçant la solution tampon par du dioxanne purifié. A la fin de la fixation, le dioxanne est évaporé à froid et sous vide et on reprend le résidu par 15 cm³ de solution tampon. On procède ensuite comme ci-dessus, pour la réticulation et pour la récupération du dérivé insoluble et du filtrat.

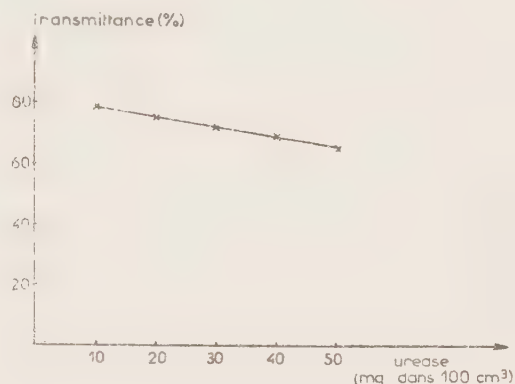
Mesure de l'activité de l'uréase en solutions-étalons, selon le même protocole opératoire que celui utilisé par la suite pour mesurer l'activité des dérivés insolubles uréase/polymère et de l'uréase non fixée.

On ajoute des quantités données d'uréase (1 à 20 mg) à une solution de HNa₂PO₄ à 18 ‰ (10 cm³). On agite magnétiquement pendant 10 mn puis on ajoute à la suspension homogène une solution d'urée à 2 g/l (20 cm³). Après 5 mn d'incubation à 25°, on arrête la réaction par addition de quelques gouttes de HCl 0,01 N. A 1 cm³ de cette solution, on ajoute 4 cm³ de ZnSO₄ à 20 ‰ et 4 cm³ de soude 0,1 N. Après filtration, on place 1 cm³ de filtrat dans la cuve d'un spectrophotomètre Beckmann, auquel on ajoute 0,5 cm³ de réactif de Nessler et 2 cm³ d'eau (23). On mesure la transmittance du mélange à 490 nm, ce qui permet de tracer une courbe d'étalonnage de la transmittance en fonction de la masse d'uréase utilisée. La courbe obtenue est rectiligne :



On dissout des quantités données d'uréase (10, 30, 50 mg) dans 100 cm³ d'une solution de HNa₂PO₄ à 18 ‰, puis on laisse reposer de 24 à 48 h à température ambiante (conditions identiques à celles subies par l'uréase restant en solution après réaction avec les polymères). On prend alors 10 cm³ de cette solution auxquels

on ajoute 20 cm³ d'une solution d'urée à 2 g/l et l'on mesure l'activité enzymatique comme ci-dessus. On obtient les mêmes résultats que précédemment, ce qui montre que l'uréase ainsi traitée ne subit pas de dénaturation appréciable. Les résultats obtenus sont transcrits sur la courbe ci-dessous :



Mesure de l'activité des dérivés insolubles et de l'uréase non fixée.

Le dérivé insoluble séché (1 g) est mis en suspension dans une solution de HNa₂PO₄ à 18 ‰ (10 cm³). Après 10 mn d'agitation magnétique, on opère comme il est indiqué ci-dessus pour les solutions-étalons. Après réaction avec l'urée, le dérivé est filtré sur verre fritté et le filtrat est récupéré et traité par quelques gouttes d'HCl 0,01 N. Le filtrat contenant l'uréase non fixée est constitué par 100 cm³ d'une solution tampon HNa₂PO₄ à 18 ‰. On prend 10 cm³ de ce filtrat et l'on mesure son activité comme il est indiqué ci-dessus, en admettant que l'uréase non fixée n'a pas été dénaturée par la présence du polymère.

Dans le tableau ci-dessous, qui rassemble les résultats obtenus, m_1 est la masse d'uréase pure ayant même activité que le dérivé insoluble considéré, m_2 est la masse d'uréase non fixée sur le polymère et présente dans les filtrats. La masse m_3 d'uréase fixée sur le polymère est donnée par la différence $m_3 = (50 - m_2)$ mg. Les masses m_1 et m_2 sont déterminées d'après les courbes de transmittance ci-dessus.

L'abréviation tr. représente la transmittance.

L'activité relative r du dérivé uréase/support par rapport à l'uréase de départ est donnée par le rapport $r = \frac{m_1}{50 - m_2}$.

Dérivé insoluble	Temps de réaction (et température)	Milieu réactionnel	Agent réticulant	m_1		m_2		m_3 mg	Activité relative $r \times 100$
				Tr. %	mg	Tr. %	mg		
I	24 h (20°)	tampon	φ -CH ₂ NH ₂ concentrée	67	5	70	40	10	50
II	24 h (20°)	tampon	(CH ₂ NH ₂) ₂ concentrée	58	9	71	36	14	65
III	48 h (20°)	tampon	(CH ₂ NH ₂) ₂ concentrée	65	6	69	42	8	75
IV	72 h (20°)	tampon	φ -CH ₂ NH ₂ diluée	68	5	72	32	18	27
V	72 h (20°)	dioxanne	(CH ₂ NH ₂) ₂ concentrée	71,5	3	71	36	14	21
VI	72 h (30°)	tampon	φ -CH ₂ NH ₂ diluée	67	5	72	32	18	27
VII	72 h (40°)	tampon	φ -CH ₂ NH ₂ diluée	73	2,5	70	40	10	25
VIII	48 h (20°)	dioxanne	φ -CH ₂ NH ₂ concentrée	58	9	71	36	14	65
IX	24 h (20°)	dioxanne	φ -CH ₂ NH ₂ concentrée	70	4	68	44	6	66

Pour les dérivés I, II, IV, l'activité résiduelle n'avait pas varié deux fois après leurs préparations.

Activité du dérivé II en fonction du pH.

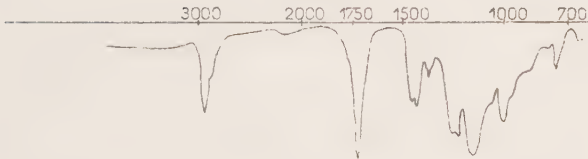
On met le dérivé II (1 g) en suspension dans 10 cm³ d'une solution tampon phosphate permettant de fixer le pH du mélange. On agite 10 mn puis on ajoute 20 cm³ d'une solution d'urée à 2 g/l. On laisse incuber 5 mn puis on filtre sur verre fritté, le filtrat étant récupéré puis traité par quelques gouttes de HCl 0,01 N. L'activité est mesurée comme ci-dessus pour les solutions-étalons. On observe une activité maximale à pH 7, comme pour l'uréase pure (34). L'activité relative *r* du dérivé aux différents pH a été calculée comme étant le rapport entre la masse *m* d'uréase pure ayant même activité à pH 8,8 que le dérivé au pH considéré, et la masse maximum trouvée pour ce même dérivé à pH 7. Le dérivé insoluble présente à pH 7 une activité équivalente à celle de 14,5 mg d'uréase pure à pH 8,8.

A pH 8,8, le dérivé insoluble présente un peu plus de 60 % de son activité maximale.

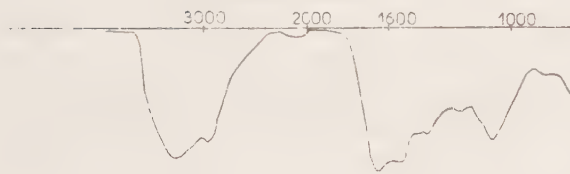
pH	transmittance (%)	<i>m</i> (mg)	<i>r</i> (%)
6	60	8	55
6,5	54	11	75
7	48	14,5	100
7,5	52	12,5	86
8	54	11	75
8,5	56	10	69
9	58	9	62

Spectres I.R.

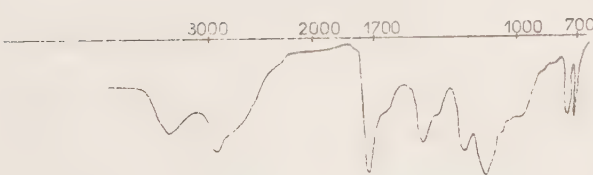
Poliodal-4



Uréase pure



Dérivé insoluble II



2. — Préparation et propriétés de dérivés insolubles de la trypsine.

Fixation de la trypsine.

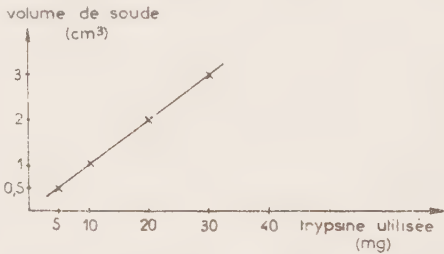
On utilise le mode opératoire général suivant : dans une fiole conique de 25 cm³, on agite pendant 24 h à 2° une suspension de 1 g de polymère et de 50 mg de trypsine (de Merck) dans 15 cm³ de solution tampon phosphate (KH₂PO₄, 0,1 M) à pH = 7,2. A la fin de la réaction, on place la suspension dans un tube à centri-

fugation, on lave la fiole plusieurs fois à l'eau distillée (volume total : 35 cm³), on ajoute les eaux de lavage à la suspension puis on centrifuge à 4 000 t/m pendant 5 mn. Après récupération du liquide surnageant, le précipité est lavé sur verre fritté n° 3 (Prolabo) en plusieurs fois avec de l'eau distillée (volume total : 50 cm³). Les différentes solutions limpides ainsi obtenues sont rassemblées (volume total : 100 cm³).

Après mesure de l'activité trypsique du dérivé insoluble obtenu (1 g sec), ce dernier est conservé selon la littérature (19) à 4° et en suspension dans une solution de HCl 0,0025 N.

Mesure de l'activité de la trypsine de départ.

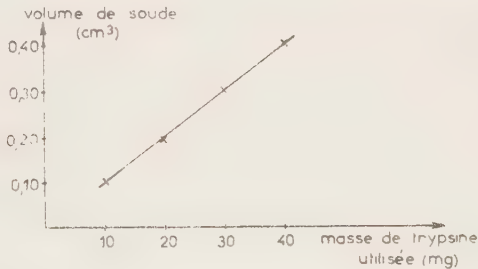
a) On ajoute 85 cm³ d'eau distillée à 15 cm³ d'une solution de tampon phosphate (KH₂PO₄, 0,1 M) à pH = 7,2. On obtient ainsi 100 cm³ de solution A (ainsi désignée dans la suite du texte). Dans un bécher de 25 cm³ on place 10 cm³ de solution A et une certaine quantité de trypsine pure. Après 5 mn d'agitation magnétique, on amène le pH à 7,8 par addition de soude 0,046 N puis on ajoute 10 cm³ d'une solution 0,015 N de chlorhydrate de N-benzoyl L-arginine méthyl ester, préparé selon la méthode de McDONALD (27). On détermine l'activité estérolytique de la trypsine à 20° par addition contrôlée de soude 0,046 N au milieu réactionnel, de façon que le pH reste toujours égal à 7,8 au cours du temps. On note le volume total de soude versée en 10 mn, en fonction de la masse de trypsine mise en œuvre :



b) On laisse 24 h à 2° une solution de 10 mg de trypsine dans 15 cm³ de tampon phosphate (KH₂PO₄, 0,1 M) à pH = 7,2, puis on ajoute 85 cm³ d'eau distillée afin d'obtenir une solution de 10 mg de trypsine dans 100 cm³ de solution A.

Dans un bécher de 25 cm³ on place 10 cm³ de cette solution, on amène le pH à 7,8 par addition de soude 0,046 N, puis on ajoute 10 cm³ de solution 0,015 N de chlorhydrate de N-benzoyl L-arginine méthyl ester et on mesure — comme ci-dessus — l'activité de la solution en utilisant une burette au centième de cm³. Les résultats obtenus pour différentes quantités de trypsine sont rassemblés dans le tableau ci-après :

Trypsine utilisée (mg)	Trypsine contenue dans 10 cm ³ de solution A (mg)	Sonde 0,046 N ajoutée en 10 mn (cm ³)
10	1	0,10
20	2	0,19
30	3	0,31
40	4	0,40



Conclusion : Le volume de soude ajouté est proportionnel à la masse de trypsine et d'autre part, après un séjour de 24 h à 2° dans une solution à pH = 7,2, la trypsine conserve son activité initiale.

Ces résultats permettent de déterminer la quantité de trypsine se trouvant dans une solution inconnue et de mesurer l'activité des dérivés insolubles.

Mesure de l'activité des combinaisons trypsine/support.

On opère comme ci-dessus pour les solutions-étalons. Le dérivé insoluble est agité pendant 5 mn dans 10 cm³ de solution A, on amène le pH à 7,8 par addition de soude 0,046 N, puis on ajoute 10 cm³ de la solution 0,015 N de substrat et on mesure l'activité pendant 10 mn à pH = 7,8 et 20°.

Dosage de la trypsine non fixée.

On prend 10 cm³ de filtrat (soit 1/10), on amène le pH à 7,8 par addition de soude 0,046 N, on ajoute 10 cm³ de la solution 0,015 N de substrat puis on mesure l'activité pendant 10 mn à pH = 7,8 et 20°.

De même que pour l'uréase, on appelle m_1 (mg) la masse de trypsine ayant même activité que le dérivé insoluble, m_2 (mg) la masse de trypsine non fixée présente dans les filtrats et m_3 (mg) la masse de trypsine contenue dans le dérivé insoluble et obtenue par la différence $m_3 = (50 - m_2)$ mg. Dans ces conditions, le pourcentage d'activité résiduelle r du dérivé insoluble est donné par la relation $r = 100 \frac{m_1}{m_3}$. m_1 et m_2 sont déterminés à partir des courbes précédentes, connaissant le volume v de soude 0,046 N ajoutée en 10 mn à 20°. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous dans lequel v (dérivé) et v (solution) repré-

Par conséquent, m est très voisin de m_2 . Ce résultat montre que les deux techniques utilisées pour le dosage de la trypsine donnent des résultats sensiblement identiques.

Adsorption de trypsine sur le polyméthacrylate de *n*-butyle.

Le polyméthacrylate de *n*-butyle est mis en présence de trypsine dans les mêmes conditions opératoires que pour les *poliodals*-4 utilisés ci-dessus. La masse de polymère mise en œuvre est de 1 g et la masse de trypsine de 50 mg. Soit m_1 (mg) la masse de trypsine présente dans les filtrats, $m_2 = (50 - m_1)$ mg la masse de trypsine adsorbée sur le polymère et soit v le volume de soude 0,046 N ajoutée. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

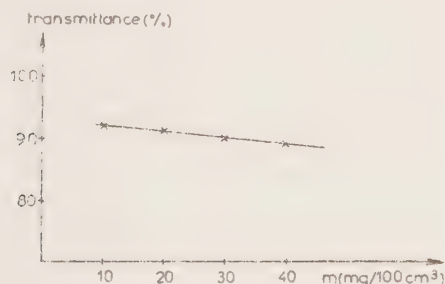
		v (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)
1 ^{er} essai	polymère	0,56		5,6
	solution	0,44	44	
2 ^e essai	polymère	0,49		4,9
	solution	0,45	45	

Polymère	v (solution) (cm ³)	v (dérivé) (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	m_3 (mg)	$r = 100 m_1/m_3$ (%)
Poliodal-4	0,14	1,12	11,2	14	36	31
Copoliodal-411	0,16	0,91	9,1	16	34	26
Copoliodal-412	0,20	0,84	8,4	20	30	28
Copoliodal-413	0,21	0,80	8	21	29	27
Copoliodal-415	0,24	0,72	7,2	24	26	27

sentent respectivement les volumes de soude utilisés lors des mesures des activités du dérivé insoluble et de la solution correspondante de trypsine non fixée.

Dosage par absorption ultraviolette.

On mesure la transmittance à 280 nm (19) (spectrophotomètre Beckmann) de diverses solutions-étalons obtenues en dissolvant m (mg) de trypsine dans 100 cm³ de solution A.



Deux « solutions de trypsine non fixée » provenant des essais précédents ont été ainsi dosées et ont fourni les résultats suivants :

Polymère utilisé	Transmittance (%)	m (mg)	m_2 (mg)
Copoliodal-413	92,2	≈ 19	21
Copoliodal-415	91,4	≈ 23	24

BIBLIOGRAPHIE.

- (1) E. RIESEL et E. KATCHALSKI, *J. biol. Chem.*, 1964, **239**, 1521.
- (2) E. KATCHALSKI et A. BAR-ELI, *Brevet Britannique* n° 916 931, 1963; *Chem. Abstr.*, 1963, **58**, 11 618 h.
- (3) E. KATCHALSKI et A. BAR-ELI, *Brevet Israélien* n° 13 950, 1960; *Chem. Abstr.*, 1962, **56**, 7 702 h.
- (4) M. KITAJIMA et S. MIYANO, *Kogyo Kagaku Zasshi*, 1969, **72** (2), 493; *Chem. Abstr.*, 1969, **70**, 26, 118 067 a.
- (5) *Chem. Eng. News*, 15 février 1971, p. 86.
- (6) A. N. GLAZER, A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, *J. biol. Chem.*, 1962, **237**, 1832.
- (7) H. D. BROWN, A. B. PATEL et S. K. CHATTOPADHYAY, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1968, **2** (2), 231.
- (8) T. WIELAND, H. DETERMANN et K. BUENNIG, *Z. Naturforsch.*, 1966, **21** (10), 1003; *Chem. Abstr.*, 1967, **66**, 72 611 k.
- (9) J. DOBO et P. KARPATY, *Brevet Allemand* n° 1 955 638, 11 juin 1970; *Chem. Abstr.*, 1970, **73**, 52 597 b.
- (10) E. M. CROOK et G. KAY, *Brevet Sud Africain* n° 68 04 010, 1968; *Chem. Abstr.*, 1969, **71**, 14 363 y.
- (11) H. H. WEETALL, *Science*, 1969, **166** (3905), 615.
- (12) T. WAGNER, C. J. HSU et G. KELLEHER, *Biochem. J.*, 1968, **108** (5), 892.
- (13) Y. OHNO et M. E. STAHMANN, *Brevet Japonais* n° 70 06 875, 9 mars 1970; *Chem. Abstr.*, 1970, **73**, 10 965 q.
- (14) B. S. WILDI et T. L. WESTMAN, *Brevet Allemand* n° 1 945 680, 13 août 1970; *Chem. Abstr.*, 1970, **73**, 94 940 p.
- (15) Y. LEVIN, M. PECHT, L. GOLDSTEIN et E. KATCHALSKI, *Biochem.*, 1964, **3** (12), 1905.
- (16) R. AXEN et J. PORATH, *Nature*, 1966, **210** (5034), 367.
- (17) A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, *Nature*, 1960, **188**, 856.
- (18) M. A. MITZ et L. J. SUMMARI, *Nature*, 1961, **189**, 576.
- (19) A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, *J. biol. Chem.*, 1963, **238**, 1689.
- (20) I. H. SILMAN et E. KATCHALSKI, *Ann. Rev. Biochem.*, 1966, **35**, part. II, 873.
- (21) H. R. MAHLER et E. H. CORDES, *Biological Chemistry*, Harper and Row, London, 1967, p. 12.

- (22) E. S. WEST, W. R. TODD, H. S. MASON et J. J. VAN BRUGGEN, *A text book of Biochemistry*, Mc Millan, London, 1970, p. 326.
- (23) Y. TIFFON, J. P. PUJOL et P. LUBET, *Trav. Prat. de Biologie des Animaux*, Faculté des Sciences, Caen.
- (24) W. N. FISHBEEIN, *J. biol. Chem.*, 1969, **244** (5), 1188.
- (25) C. H. W. HIRS, M. HALMAN et J. KYCIA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1965, **111**, 209.
- (26) W. H. STEIN, *Brookhaven Symp. Biol.*, 1960, **13**, 104.
- (27) C. E. McDONALD et A. K. BALLS, *J. biol. Chem.*, 1957, **229**, 69.
- (28) C. GHELIS, *Communication Personnelle*.
- (29) H. BRANDENBERGER, *Rev. Ferment. Ind. Aliment.*, 1956, **11**, 237.
- (30) A. S. LINDSEY, *J. Macromol. Sci., Revs. Macromol. Chem.*, 1969, **C 3** (1), 1.
- (31) R. ZWILLING et V. TOMASEK, *Nature* (London), 1970, **228**, 57.
- (32) E. J. DEVELLEZ et D. R. JOHNSON, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1968, **24** (2), 661.
- (33) Y. TIFFON, *Communication Personnelle*.
- (34) H. BRANDENBERGER, *Helv. chim. Acta*, 1957, **40**, 61.
- (35) C. E. McDONALD et A. K. BALLS, *J. biol. Chem.*, 1957, **229**, 69.

N° 736. — Enzymes insolubilisées.

III. — Préparations et propriétés de dérivés insolubles du chymotrypsinogène-A et des chymotrypsines α et δ , *

par Éric BROWN et André RACOIS.

(Laboratoire de synthèse organique, Faculté des Sciences, 72-Le Mans.)

(Manuscrit reçu le 8.6.71.)

Les chymotrypsines α et δ réagissent en présence d'acide phényl-3 propionique (inhibiteur réversible) sur les homopolymères ou les copolymères (avec le méthacrylate de méthyle) des méthacrylates d'iodo-2 éthyle ou d'iodo-4 *n*-butyle (*Poliodals*). On obtient ainsi des dérivés insolubles dont l'activité enzymatique résiduelle (AER) est d'environ 20 % de celle de l'enzyme initiale. L'AER observée est inférieure à 10 % pour les dérivés insolubles préparés en l'absence d'inhibiteur. La quantité d'enzyme fixée est d'autant plus grande que la chaîne latérale réactive du *Poliodal* est plus longue, et d'une manière générale elle est plus importante pour les homopolymères que pour les copolymères correspondants.

De façon analogue, on a préparé des dérivés insolubles du chymotrypsinogène-A, mais il n'a pas été possible d'obtenir une chymotrypsine insoluble et active en traitant ces dérivés par la trypsinase dans différentes conditions.

Un certain nombre de combinaisons insolubles chymotrypsine-support macromoléculaire ont été décrites dans la littérature (1 à 8). Nous allons indiquer rapidement les diverses techniques d'insolubilisation utilisées pour préparer ces combinaisons :

a) *Méthode par « insertion »* dans une résine (1), l'activité catalytique ne paraissant pas altérée par ce traitement.

b) *Méthode par pontage* :

L'enzyme est fixée sur un polymère réactif par l'intermédiaire d'un agent de réticulation bifonctionnel tel que la trichloro-2,4,6 *s*-triazine (2) ou l'amino-2 dichloro-4,6 *s*-triazine (3). Dans ce dernier cas, diverses études ont montré que le taux de fixation était une fonction croissante de la température, du temps de réaction ou du pH et que, d'une manière générale, le taux de fixation et l'activité enzymatique résiduelle variaient en sens inverse l'un de l'autre.

c) *Méthode par fixation sur un polymère au moyen de liaisons covalentes* :

Le polymère utilisé possède des groupements fonctionnels réactifs qui sont amenés à réagir sur les groupements aminés libres de l'enzyme (tels que les $-\text{NH}_2$ en position ϵ de la lysine).

Ainsi, la chymotrypsine a pu être liée à des copolymères de L-alanine et d'acide L-glutamique au moyen du réactif de Woodward (le N-éthyl phényl-5 isoxazolium sulfonate-3'), avec un taux de fixation de 74 % et une activité résiduelle de 38 % (4). Par réaction avec un polyazoture d'acyle, la chymotrypsine conduit à un dérivé insoluble dont l'activité est supérieure à celle des combinaisons préparées avec les autres types de polymères et dont la durée de conservation est plus élevée que celle de l'enzyme originelle (5).

Outre ces types de polymères, on a utilisé également avec succès des polyisothiocyanates (6) et des supports comportant des groupements diazonium qui donnent lieu à une fixation importante d'enzyme (7).

Sur le plan pratique, une chymotrypsine insolubilisée par fixation sur un tissu au moyen de la trichloro-2,4,6 *s*-triazine a été utilisée dans une colonne pour catalyser en continu l'hydrolyse de différents substrats de cette enzyme (8).

Préparation de dérivés insolubles de l' α -chymotrypsine.

Afin de préparer de nouveaux types de chymotrypsine insoluble, nous avons utilisé les divers polymères hydrophiles décrits précédemment : les *Poliodals*-2 et 4, le *Copiodal*-213 et surtout le *Copiodal*-413, les copolymères étant d'un meilleur prix de revient que les homopolymères déjà utilisés dans le cas de l'uréase et de la trypsinase.

Le greffage d' α -chymotrypsine lyophilisée (50 mg par essai) sur ces polymères (1 g par essai) a été réalisé en présence d'acide phényl-3 propionique (inhibiteur réversible et compétitif de l'enzyme), en solution tampon borax 0,1 M, à divers pH (8 et 8,5), pendant des temps variables (1 à 36 h) et à différentes températures (2 ou 20°). Les dérivés insolubles ainsi obtenus étaient finalement récupérés par simple filtration.

L'activité chymotrypsique des dérivés insolubles a été mesurée à pH = 8 par titrage à la soude de l'acide carboxylique libéré par hydrolyse enzymatique d'un substrat de la chymotrypsine, l'ester éthylique de la N-acétyl-L-tyrosine (ATEE) (3). Une courbe donnant la masse de substrat hydrolysé en 10 mn, en fonction de la masse de chymotrypsine pure utilisée, a permis de calculer de la même façon que pour l'uréase et la tryp-

(*) Précédent mémoire, E. BROWN et A. RACOIS, *Bull. Soc. chim. Fr.*, 1971, p. 4351.

sine, la masse d'enzyme fixée sur le polymère et l'activité relative du dérivé insoluble par rapport à la chymotrypsine originelle. Là encore, nous avons calculé la quantité d'enzyme fixée sur les polymères par la différence entre la masse totale mise en œuvre (soit 50 mg) et la masse non fixée présente dans les filtrats. Cette masse d'enzyme non fixée a été évaluée par mesure de l'activité chymotrypsique du filtrat, nos travaux précédents sur la trypsine ayant montré le bien-fondé de cette méthode.

Nous avons constaté que pour un même support macromoléculaire, la masse d'enzyme fixée est d'autant plus importante que le pH, le temps ou la température de fixation sont plus élevés, ce qui entraîne parallèlement une diminution d'autant plus grande de l'activité enzymatique du dérivé. Ces résultats sont analogues à ceux décrits par KAY et LILLY (3), mais l'amplitude des variations observées est moins grande en ce qui nous concerne. De plus, nous avons constaté que pour un même polymère, dans des conditions identiques de pH, de temps ou de température, le taux de fixation de la chymotrypsine est plus important en l'absence d'inhibiteur, mais que l'activité enzymatique est relativement plus faible pour le dérivé insoluble ainsi obtenu. Une étude comparée de la fixation de la chymotrypsine sur les *Poliodals-2* et *4* et sur les *Copoliodals-213* et *413* a montré que les masses d'enzyme fixée étaient légèrement plus élevées pour les homopolymères que pour les copolymères. Ce résultat n'est d'ailleurs pas étonnant, étant donné que les groupements fonctionnels réactifs —CH₂I sont relativement plus nombreux sur les homopolymères que sur les copolymères correspondants. Enfin, nous avons pu constater que le *Poliodal-4* fixait davantage d'enzyme que le *Poliodal-2* ce qui montre que le groupement —CH₂I est d'autant plus réactif vis-à-vis des enzymes que la chaîne latérale qui le relie au support macromoléculaire est plus longue.

En conclusion, et compte tenu de la masse et de l'activité résiduelle de l'enzyme fixée, ainsi que du prix de revient du polymère, il semble que les conditions de fixation les plus avantageuses soient les suivantes : 24 h à 2° et à pH = 8, en présence d'inhibiteur et avec le *Poliodal-4* comme support. Dans ces conditions, le taux de fixation de l'enzyme par rapport à la masse mise en œuvre (50 mg) est de 28 % pour une activité résiduelle de 17 %.

Nous avons d'autre part effectué des fixations de 50 mg d' α -chymotrypsine dans le tétrahydrofurane en présence ou non d'inhibiteur (acide phényl-3 propionique). Après 24 h d'agitation, le solvant est évaporé à froid, et le résidu solide repris par une solution tampon borax (pH = 8). La récupération et l'étude du dérivé insoluble et des filtrats ont été ensuite effectuées de la façon habituelle. Les mesures d'activité enzymatique ont montré que le dérivé insoluble contenait plus d'enzyme fixée que les dérivés préparés ci-dessus en solution tampon, et que l'activité résiduelle était également plus importante. Mais il semblerait que ces résultats apparemment intéressants soient dus à une adsorption importante de l'enzyme à la surface du support, la chymotrypsine physiquement adsorbée dans ces conditions étant très difficile à éliminer.

Préparation de dérivés insolubles de la δ -chymotrypsine.

La δ -chymotrypsine utilisée était nettement plus active que l' α -chymotrypsine ci-dessus.

Les résultats obtenus en ce qui concerne la masse fixée et l'activité résiduelle sont sensiblement identiques pour les deux types de chymotrypsine.

Des études cinétiques (9) ont montré que la fixation de la δ -chymotrypsine sur les *Poliodals* entraînait une diminution notable de la constante de vitesse k_{obs} de cette enzyme avec, corrélativement, une augmentation

importante de la constante de Michaelis K_m . Enfin, des études d'inhibition (9) de la δ -chymotrypsine insolubilisée indiquent que le nombre de sites actifs présents a diminué par rapport à l'enzyme originelle, ce qui tend à établir que les groupements —CH₂I réagissent sur les enzymes de façon non spécifique et ne se limitent pas à l'acylation pure et simple des groupements —NH₂ libres en position ϵ de la lysine. Les résultats énoncés dans le tableau ci-dessous sont donnés à titre comparatif.

Enzyme	K_{obs} (s ⁻¹) (ATEE)	K_m (mM) (ATEE)	Sites actifs (NPA)
δ -chymotrypsine initiale ..	235	1,0	0,95
δ -chymotrypsine insolubilisée avec inhibiteur	40	12	0,60
δ -chymotrypsine insolubilisée sans inhibiteur	10	*	0,30

Nous avons traité une même solution de δ -chymotrypsine (50 mg au départ) successivement par quatre fractions de 1 g de *Poliodal-4* dans les conditions habituelles (24 h à 2° et à pH = 8) afin d'étudier comment variait le taux de fixation et l'activité résiduelle au cours d'essais successifs.

Nous avons ainsi obtenu quatre dérivés insolubles pesant environ 1 g chacun et numérotés successivement I, II, III et IV. Comme on pouvait s'y attendre, le n° I était analogue aux dérivés déjà décrits ci-dessus, mais par contre, si le n° II se caractérisait par un taux pondéral de fixation analogue, il présentait une activité résiduelle plus importante (34 contre 13 % pour le n° I). Ce résultat semble indiquer que le polymère fixe les petites molécules protéiques (impuretés ou enzyme dénaturée) préférentiellement aux molécules normales d'activité maximale (10 et 11). Les dérivés III et IV présentaient une activité faible vraisemblablement en raison d'un temps de fixation trop long.

Préparation de dérivés insolubles de l' α -chymotrypsinogène.

On sait que la trypsine catalyse la transformation du chymotrypsinogène inactif en chymotrypsine active (12).

Nous avons constaté que les quantités de chymotrypsine, présente à l'état d'impureté, dans la trypsine et le chymotrypsinogène utilisés, étaient négligeables comparées aux quantités et à l'activité de la chymotrypsine susceptible d'être obtenue à partir de ce même chymotrypsinogène (voir partie expérimentale).

Nous avons fait réagir le chymotrypsinogène (50 mg) sur le *Poliodal-4* (1 g) pendant 24 h à 4° et en solution borax, les pH étant de 8, 8,5 ou 8,8 selon les cas. Pour chaque essai, nous avons obtenu environ 1 g de dérivé insoluble facilement récupéré par filtration et 100 cm³ de filtrat contenant le zymogène non fixé. Ce filtrat ne présentait plus qu'une très faible activité chymotrypsique, ce qui tend à prouver qu'une fraction importante de la chymotrypsine présente dans le chymotrypsinogène à l'état d'impureté, s'est trouvée fixée sur le support avec une dénaturation d'ailleurs très importante.

Le chymotrypsinogène insolubilisé, ou présent dans les filtrats, a été traité par la trypsine selon la méthode de la littérature (12) et l'activité de la chymotrypsine ainsi produite a été mesurée de la façon habituelle (voir ci-dessus).

La quantité de zymogène fixé est donnée par la diffé-

rence entre la masse totale mise en œuvre (soit 50 mg) et la masse non fixée présente dans les filtrats.

Nous avons constaté que la masse de zymogène fixé variait de 18 à 22,5 mg et qu'elle augmente quand le pH croît. Tous les essais d'activation selon la littérature (12) du zymogène fixé se sont révélés infructueux. Par contre, les solutions de lavage du dérivé insoluble, récupérées après activation, contenaient un peu de chymotrypsine dont la présence peut s'expliquer de deux façons : du chymotrypsinogène physisorbé sur le polymère aurait pu passer en solution pour être ensuite activé par la trypsine présente; ou bien de la chymotrypsine aurait pu être libérée à partir du dérivé insoluble par coupure sous l'action de la trypsine.

Les échecs rencontrés lors des tentatives d'activer le chymotrypsinogène insolubilisé, suggèrent que ce zymogène est fixé sur le polymère de telle façon que la coupure d'activation ne puisse être effectuée. L'activation du chymotrypsinogène par la trypsine est en principe achevée au bout de 90 mn (12), mais dans le cas présent, nous n'avons obtenu aucun résultat même au bout de 24 h.

Par contre, nous avons utilisé avec succès un de nos dérivés insolubles de la trypsine pour activer du chymotrypsinogène pur, en opérant dans des conditions opératoires semblables à celles qui font intervenir la trypsine soluble. Dans ces conditions, le chymotrypsinogène a fourni avec un rendement quantitatif une chymotrypsine d'activité maximale.

Conclusion.

Les *Poliodals* fixent moins de chymotrypsine que de trypsine et l'activité résiduelle des dérivés insolubles obtenus est nettement moindre que dans le cas de l'uréase ou de la trypsine. Enfin, le chymotrypsinogène insolubilisé n'a pu être activé. Ces résultats sembleraient indiquer que le groupement $-\text{CH}_2\text{I}$ ne réagit pas de façon spécifique sur les $-\text{NH}_2$ libres en position ϵ de la lysine mais qu'au contraire, la fixation peut très bien se faire sur les sites actifs et les divers groupements fonctionnels disponibles dans les enzymes utilisées.

En ce qui concerne le chymotrypsinogène, il est légitime de penser que les réarrangements structuraux nécessaires pour son activation ne peuvent s'effectuer après sa fixation sur les *Poliodals*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Dérivés insolubles de l' α -chymotrypsine.

Fixation de l' α -chymotrypsine sur le copoliodal-413.

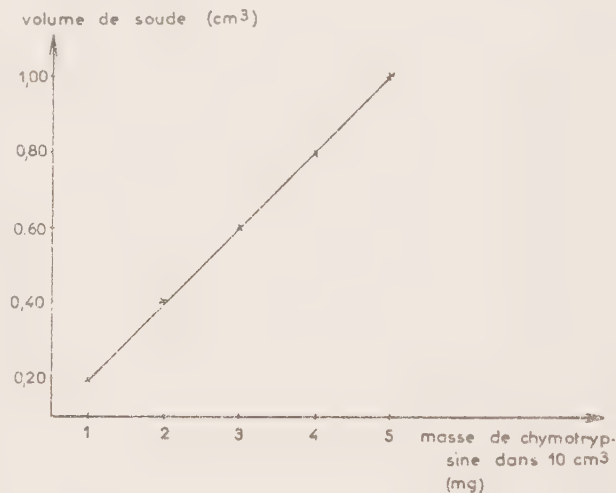
Dans une fiole conique de 25 cm³, on agite magnétiquement à 2 ou 20° et pendant un temps donné (1 à 36 h), une suspension de 1 g de copoliodal-413 et de 50 mg d' α -chymotrypsine (de CHOAY) dans 20 cm³ d'une solution tampon borax 0,1 M (pH = 8 ou 8,5), en présence ou non d'acide phényl-3 propionique 0,02 N (inhibiteur). A la fin de la réaction, on filtre le dérivé sur verre fritté n° 3 (Prolabo) et on le lave soigneusement en l'agitant avec de petites quantités de NaCl, N (total : 40 cm³) puis d'eau distillée (total : 40 cm³). Les filtrats sont rassemblés (100 cm³ au total) et le dérivé insoluble est séché sous vide et conservé à 4°.

La fixation dans 20 cm³ de tétrahydrofurane (THF) purifiée est réalisée à 2° avec ou sans inhibiteur (10^{-2} N) et en prenant les mêmes quantités de polymère et d'enzyme que ci-dessus. A la fin de la réaction, le THF est évaporé à froid au rotavapor et le résidu est repris par 20 cm³ de solution tampon borax 0,1 M (pH = 8). On procède ensuite comme ci-dessus pour la récupération du dérivé insoluble et du filtrat.

Mesure de l'activité de l' α -chymotrypsine en solutions-étalons, selon le même protocole opératoire que celui utilisé par la suite pour mesurer l'activité des dérivés insolubles chymotrypsine-support et de la chymotrypsine non fixée.

A 100 cm³ de solution A obtenue en mélangeant 20 cm³ de solution tampon borax 0,1 M (pH = 8), 40 cm³ de chlorure de sodium aqueux N, et 40 cm³ d'eau distillée, on ajoute des quantités données de chymotrypsine (10 à 50 mg).

Dans un bêcher de 25 cm³ muni d'une agitation magnétique, on place 10 cm³ d'une des solutions précédentes et on ajoute 10 cm³ d'une solution 0,025 N fraîchement préparée de *N*-acétyl-*L*-tyrosine éthyl ester (ATEE) (substrat). On détermine l'activité estérolytique de l' α -chymotrypsine à 25° par addition contrôlée de soude 0,050 N au milieu réactionnel, de façon que le pH reste toujours égal à 8 au cours du temps. On note le volume total de soude versée en 3 mn, en fonction de la masse de chymotrypsine présente dans les 10 cm³ de solution :



Le volume de soude ajouté est proportionnel à la masse de chymotrypsine mise en œuvre. D'autre part, on a vérifié que des solutions tamponnées (pH = 8 ou 8,5) d' α -chymotrypsine, après avoir été abandonnées 24 h à 2 ou 20°, présentaient la même activité que des solutions identiques fraîchement préparées. De même, un séjour de 24 h à 2° dans le THF n'a pas dénaturé l' α -chymotrypsine de façon sensible. Ces résultats permettent de déterminer la quantité de chymotrypsine présente dans une solution inconnue et de mesurer l'activité des dérivés insolubles.

Mesure de l'activité des combinaisons chymotrypsine-support.

Le dérivé insoluble est agité pendant 10 mn dans 10 cm³ de solution A, puis on ajoute 10 cm³ de la solution 0,025 N de substrat et on mesure l'activité pendant 3 mn à 25° et à pH = 8.

Dosage de la chymotrypsine non fixée présente dans les filtrats.

Le pH du filtrat est amené à 8, si besoin est, par addition d'acide chlorhydrique 0,1 N. On prend 10 cm³ (soit le dixième) de ce filtrat, on ajoute 10 cm³ de la solution 0,025 N de substrat puis on mesure l'activité pendant 3 mn à pH = 8.

On appelle m_1 (mg) la masse de chymotrypsine ayant même activité que le dérivé insoluble, et m_2 (mg) la masse de chymotrypsine non fixée présente dans les filtrats. La masse m_3 (mg) de chymotrypsine contenue dans le dérivé insoluble est donnée par la différence $m_3 = (50 - m_2)$ mg. Dans ces conditions, le pourcentage d'activité résiduelle r du dérivé insoluble est $r = 100 \frac{m_1}{(50 - m_2)}$.

m_1 et m_2 sont déterminés à partir de la courbe précédente, connaissant le volume v de soude 0,050 N ajoutée en 3 mn. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux ci-dessous, dans lesquels v (dérivé) et v (solution) représentent les volumes de soude respectivement utilisés lors des mesures des activités du dérivé insoluble et de la solution correspondante de chymotrypsine non fixée.

a) Fixation sur le Copoliodal-413 en fonction du temps,
en solution tampon borax pH = 8 et en présence d'inhibiteur (10^{-2} M).

Temps (h)	ν (solution) (cm ³)	ν (dérivé) (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	m_3 (mg)	$r = 100 m_1/m_3$ (%)
1	0,98	0	0	≈ 50	0	8
3	1,02	0	0	≈ 50	0	8
6	0,86	0,24	1,2	43	7	17
12	0,84	0,26	1,3	42	8	16
18	0,80	0,34	1,7	40	10	17
24	0,76	0,38	1,9	38	12	16
36	0,75	0,36	1,8	37,5	12,5	14,5

b) Fixation sur le Copoliodal-413 en fonction du temps,
de la température, du solvant et en présence d'inhibiteur (10^{-2} M).

Solution de 20 cm ³	Temps (h)	Température (°)	ν (solution) (cm ³)	ν (dérivé) (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	m_3 (mg)	$r = 100 m_1/m_3$ %
Borax pH = 8	18	2	0,80	0,34	1,7	40	10	17
Borax pH = 8	24	2	0,76	0,38	1,9	38	12	16
Borax pH = 8	18	20	0,75	0,24	1,2	37,5	12,5	9,6
Borax pH = 8	24	20	0,72	0,24	1,2	36	14	8,5
Borax pH = 8,5	18	2	0,76	0,30	1,5	38	12	12,5
Borax pH = 8,5	24	2	0,73	0,32	1,6	36,5	13,5	11,8
Borax pH = 8,5	18	20	0,70	0,30	1,5	35	15	10
Borax pH = 8,5	24	20	0,68	0,28	1,4	34	16	8,7
THF	18	2	0,70	0,66	3,3	35	15	22
THF	24	2	0,65	0,84	4,2	32,5	17,5	24

c) Fixation sur le Copoliodal-413 pendant 24 h à 2° et en l'absence d'inhibiteur.

Solution utilisée	ν (solution) (cm ³)	ν (dérivé) (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	m_3 (mg)	$r = 100 m_1/m_3$ (%)
Borax pH = 8	0,70	0,24	1,2	35	15	8
Borax pH = 8,5	0,68	0,20	1	34	16	6,2
THF	0,52	0,80	4	26	24	16

d) Fixation sur différents polymères à 2° et à pH = 8, pendant 24 h et en présence d'inhibiteur (10^{-2} M).

Polymère	ν (solution) (cm ³)	ν (dérivé) (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	m_3 (mg)	$r = 100 m_1/m_3$ (%)
Copiodal-413	0,76	0,38	1,9	38	12	16
Poliodal-4	0,72	0,48	2,4	36	14	17
Copiodal-213	0,80	0,30	1,5	40	10	15
Poliodal-2	0,80	0,32	1,6	40	10	16

Dérivés insolubles de la δ -chymotrypsine.

Fixations successives de la δ -chymotrypsine
sur différents lots d'un même polymère.

Dans une fiole conique de 25 cm³, on agite pendant 24 h à 2° une suspension de 1 g de poliodal-4 et de 50 mg de δ -chymotrypsine dans 20 cm³ de solution tampon borax 0,1 M (pH = 8). A la fin de la réaction la suspension est centrifugée 5 mn à 4 000 t/mn. La solution limpide (solution B) est récupérée dans une fiole conique de 25 cm³ et le dérivé insoluble est lavé en plusieurs fois avec une solution de chlorure de sodium N (total: 60 cm³), puis avec de

l'eau distillée (total: 40 cm³). Après séchage sous vide, le dérivé est conservé à 4°. Les eaux de lavage rassemblées (total: 60 + 40 = 100 cm³) constituent la solution C.

La solution B est traitée par 1 g de poliodal-4, et on procède comme ci-dessus à une nouvelle fixation, cette opération étant répétée encore deux fois. Les trois dérivés insolubles ainsi obtenus sont récupérés comme ci-dessus.

Mesure de l'activité des dérivés insolubles et des filtrats.

La δ -chymotrypsine utilisée avait une activité enzymatique $k_{cat} = 235 \text{ mole} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25° (9) et sa masse moléculaire a été

prise égale à 25 000 (9, 13 à 15). Dans ce qui suit, les temps de réaction étant courts (30 s) et les quantités molaires d'enzyme très faibles par rapport aux quantités de substrat utilisées, on a admis que la vitesse d'hydrolyse enzymatique était maximale et donnée par la relation: $V_{\max} = k_{\text{cat}}[E_0]$ (16).

On prend 0,2 cm³ (soit un centième) de solution B auquel on ajoute 9,8 cm³ de solution A, puis 10 cm³ de solution 0,025 N de substrat. On mesure l'activité estérolytique de la chymotrypsine à 25° par addition contrôlée de soude 0,050 N au milieu réactionnel, de façon que le pH reste toujours égal à 8 au cours du temps. On détermine le nombre de moles de soude versée en 30 s et on en déduit par un calcul théorique la masse m (mg) de chymotrypsine présente dans les 20 cm³ de solution B.

On prend 10 cm³ (soit un dixième) de la solution C et on procède comme ci-dessus pour calculer la masse m' (mg) de chymotrypsine présente dans ces solutions. La masse m_2 de chymotrypsine non fixée est donnée par la somme $m_2 = m + m'$. La masse m_3 de chymotrypsine fixée est donnée par la différence entre la masse m_2 non fixée lors de l'essai précédent et la masse m_2 dans l'essai considéré.

L'activité du dérivé insoluble est étudiée comme ci-dessus en utilisant 10 cm³ de solution A et 10 cm³ de la solution 0,025 N de substrat. La masse m_1 d'enzyme originelle équivalente au dérivé est calculée comme pour m_2 et m_3 . Le taux de fixation τ est défini comme le rapport entre la masse d'enzyme fixée m_3 et la masse d'enzyme initiale disponible pour la fixation. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant:

milieu réactionnel, de façon que le pH reste toujours égal à 8 au cours du temps. On note le volume total (v) de soude versée en 1 mn, en fonction de la masse (m) de chymotrypsinogène activé présent dans la solution ainsi dosée.

Solution de départ	m (mg)	v (cm ³)
A ₁	0,10	0,39
A ₂	0,20	0,80
A ₃	0,30	1,21

Les résultats obtenus montrent que l'activité chymotrypsique du chymotrypsinogène initial est négligeable vis-à-vis de l'activité observée après traitement par la trypsine.

Étude de l'activité chymotrypsique de la trypsine servant à activer le chymotrypsinogène.

On prépare des solutions de 2,5 et 5 mg de trypsine dans 10 cm³ de solution A, qu'on ajoute à 10 cm³ d'ATEE 0,025 N (substrat).

N° des fixations	v (solution) (cm ³)	v (lavage) (cm ³)	v (dérivé) (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	m_3 (mg)	τ	$r = 100 m_1/m_3$ (%)
I	1,53	0,60	0,17	3	28,1	21,9	44	13
II	0,95	0,95	0,19	3,3	18,4	9,7	34	34

Dérivés insolubles de l' α -chymotrypsinogène.

Recherche de la chymotrypsine présente dans le zymogène.

Dans 100 cm³ d'une mélange préparé à partir de 20 cm³ de solution tampon borax 0,1 M (pH = 8), 40 cm³ de chlorure de sodium aqueux, N et 40 cm³ d'eau distillée (solution A), on ajoute des quantités déterminées (10, 20 et 30 mg) d' α -chymotrypsinogène, ce qui donne respectivement les solutions A₁, A₂ et A₃.

Dans un bécher de 25 cm³ muni d'une agitation magnétique, on place 10 cm³ d'une des solutions ainsi préparées. On ajoute 10 cm³ d'une solution 0,025 N de *N*-acétyl-L-tyrosine éthylester (ATEE) fraîchement préparée. On détermine l'activité estérolytique de la chymotrypsine contenue dans le zymogène par addition contrôlée de soude 0,050 N au milieu réactionnel, de façon que le pH reste toujours égal à 8 au cours du temps. On note le volume total v de soude versée en 1 mn, en fonction de la masse m de chymotrypsinogène présent dans les 10 cm³ de solution A₁, A₂ ou A₃ ainsi dosée.

Solution	m (mg)	v (cm ³)
A ₁	1	0,10
A ₂	2	0,20
A ₃	3	0,30

Activation du chymotrypsinogène.

L'activation du zymogène en chymotrypsine est catalysée par la trypsine (12).

Dans 50 cm³ de chacune des trois solutions A₁, A₂ et A₃, on ajoute 5 mg de trypsine lyophilisée et la solution est incubée 1 h 1/2 à 25° sous agitation magnétique.

A la fin de la réaction, on place dans un bécher de 25 cm³ muni d'une agitation magnétique, 1 cm³ de la solution de zymogène activé, 9 cm³ d'eau distillée et 10 cm³ d'une solution de substrat (ATEE) 0,025 N. On détermine l'activité estérolytique de la chymotrypsine à 25° par addition contrôlée de soude 0,050 N au

On mesure l'activité chymotrypsique de ces solutions à 25° par addition de soude 0,050 N de façon à maintenir le pH constant et égal à 8. On note le volume de soude versée en 1 mn:

Masse de trypsine (mg)	Volume de soude (cm ³)
2,5	0,55
5	1,10

Cette activité ne représente en première approximation que 5 % de l'activité de la chymotrypsine obtenue à partir du zymogène. De plus lors de l'activation, on utilise dix fois moins de trypsine que de chymotrypsinogène. L'activité chymotrypsique de la trypsine est donc négligeable par rapport à celle de la chymotrypsine produite à partir du zymogène.

Fixation du chymotrypsinogène sur le polidol-4.

Dans une fiole conique de 25 cm³, on place 20 cm³ de solution tampon borax 0,1 M (pH = 8, 8,5 ou 8,8), 1 g de polymère et 50 mg d' α -chymotrypsinogène. Après 24 h de réaction à 40°, le dérivé insoluble est filtré sur verre fritté n° 3 (Prolabo) et lavé avec plusieurs fractions de chlorure de sodium aqueux N (total: 40 cm³) puis avec de l'eau distillée (total: 40 cm³). On obtient alors 100 cm³ de filtrat et 1 g de dérivé insoluble que l'on sèche sous vide.

Étude des dérivés insolubles du chymotrypsinogène.

On utilise le mode opératoire général suivant:

a) A 10 cm³ (soit un dixième) du filtrat récupéré, on ajoute 10 cm³ d'une solution de substrat (ATEE) 0,025 N fraîchement préparée. On mesure l'activité chymotrypsique de cette solution à 25° par addition de soude 0,050 N de façon à maintenir le pH égal à 8. On note le volume de soude versée en 1 mn.

pH de la solution tampon	Temps d'activation	v (solution) (cm ³)	v' (solution) (cm ³)	v (dérivé) (cm ³)	v' (dérivé) (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)
8	90 mn	0,08	1,28	0,02	0,025	32	18
8,5	90 mn	0,03	1,15	0,015	0,02	29	21
8,8	90 mn	0,045	1,10	0,02	0,03	27,5	22,5
8,8	24 h	"	"	"	0,02	"	"

b) On active 50 cm³ du filtrat par traitement avec 5 mg de trypsine à 25° pendant 1 h 1/2 (agitation magnétique). A la fin de la réaction, on prend 1 cm³ de cette solution qu'on traite par 9 cm³ d'eau distillée puis 10 cm³ de la solution de substrat ATEE 0,025 N. On détermine à 25° l'activité estérolytique de la chymotrypsine produite, par addition contrôlée de soude 0,050 N au milieu réactionnel, de façon que le pH reste toujours égal à 8 au cours du temps. On note le volume total de soude versée en 1 mn.

c) Dans un bécher de 25 cm³ on place 100 mg de dérivé insoluble (un dixième du total) de l' α -chymotrypsinogène et 10 cm³ de solution A. On agit pendant 10 mn, afin que le solide forme une suspension homogène. Après addition de 10 cm³ de substrat (ATEE) 0,025 N, on détermine à 25° comme ci-dessus l'activité estérolytique du dérivé par addition de soude 0,050 N au mélange. On note le volume total de soude versée en 1 mn.

d) Dans un bécher de 25 cm³ on introduit 500 mg de dérivé insoluble et 10 cm³ de solution tampon borax 0,1 M (pH = 8), ajoute 2 mg de trypsine et on agit à 25° pendant 1 h 1/2 (ou même 24 h). A la fin de la réaction on filtre le dérivé sur verre fritté et on le lave avec 40 cm³ de chlorure de sodium N et 40 cm³ d'eau distillée, par petites quantités. Le dérivé insoluble est séché au dessiccateur sous pression réduite.

e) Dans un bécher de 25 cm³, on introduit 100 mg du dérivé activé et on dose son activité chymotrypsique comme dans le paragraphe c) ci-dessus.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessus, dans lequel v (solution), v' (solution), v (dérivé) et v' (dérivé) représentent respectivement les volumes de soude utilisés lors des mesures des activités du filtrat non activé, du filtrat activé, du dérivé insoluble non activé et du dérivé insoluble activé; m_1 et m_2 (mg) représentent respectivement les masses de zymogène non fixé et fixé ($m_2 = 50 - m_1$).

Le chymotrypsinogène n'a pas été activé.

Une mesure effectuée comme dans le paragraphe b) ci-dessus, de l'activité chymotrypsique des eaux de lavage du dérivé insoluble préparé à pH = 8,8 et laissé 24 h en présence de trypsine, a montré

qu'il n'y avait qu'une quantité négligeable de chymotrypsine : par conséquent le chymotrypsinogène fixé sur le polymère ne l'est pas par adsorption.

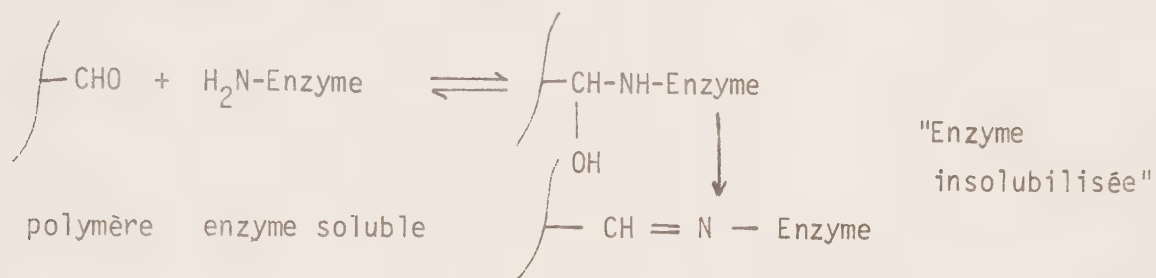
BIBLIOGRAPHIE.

- (1) H. D. BROWN, A. B. PATEL et S. K. CHATTOPADHYAY, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1968, **2** (2), 231.
- (2) E. M. CROOK et G. KAY, *Brevet Sud Africain* n° 6804010, 1968; *Chem. Abstr.*, 1969, **71**, 14 363 y.
- (3) G. KAY et M. D. LILLY, *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **198**, 276.
- (4) T. WAGNER, C. J. HSU et G. KELLEHER, *Biochem. J.*, 1968, **108** (5), 892.
- (5) M. A. STAHMANN et Y. OHNO, *Brevet U.S.* n° 3536587, 1970; *Chem. Abstr.*, 1971, **74**, 13 756 d.
- (6) R. AXEN et J. PORATH, *Nature*, 1966, **210** (5034), 367.
- (7) E. KATCHALSKI et A. BAR-ELI, *Brevet Britannique* n° 916 931, 1963; *Chem. Abstr.*, 1963, **58**, 11 618 h.
- (8) M. D. LILLY, G. KAY, R. J. H. WILSON et A. K. SHARP, *Brevet Britannique* n° 1183260, 1970; *Chem. Abstr.*, 1970, **72**, 118 062 m.
- (9) R. GHELIS, *Travaux non publiés*.
- (10) G. OURISSON, *Communication Personnelle*.
- (11) J. RIOUAL, *Communication Personnelle*.
- (12) G. W. SCHWERT et Y. TAKENAKA, *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 570.
- (13) T. R. WILLIAM et A. L. TAPPEL, *Anal. Biochem.*, 1964, **9** (2), 211.
- (14) R. AXEN, P. MYRIN et J. C. JANSON, *Biopolymers*, 1970, **9**, 401.
- (15) Y. D. KIM et R. LUMRY, *J. amer. chem. Soc.*, 1971, **93**, 1003.
- (16) E. S. WEST, W. R. TODD, H. S. MASON et J. T. VAN BRUGGEN, *Text-book of Biochemistry*, MacMillan, London, 1970, p. 453.

EMPLOI DES VANACRYLS DANS LA PREPARATION
DE NOUVEAUX DERIVES INSOLUBLES
DE LA TRYPSINE

A. PREPARATION DES VANACRYLS

Dans le but de préparer de nouveaux types d'enzymes immobilisées, nous nous sommes proposé de synthétiser des supports macromoléculaires différents de ceux utilisés jusqu'à présent. Ces polymères sont, d'une manière générale, des polyméthacrylates de vanilline qui possèdent par conséquent des groupements terminaux aldéhydes susceptibles de réagir sur les $-NH_2$ libres des enzymes selon le schéma probable :

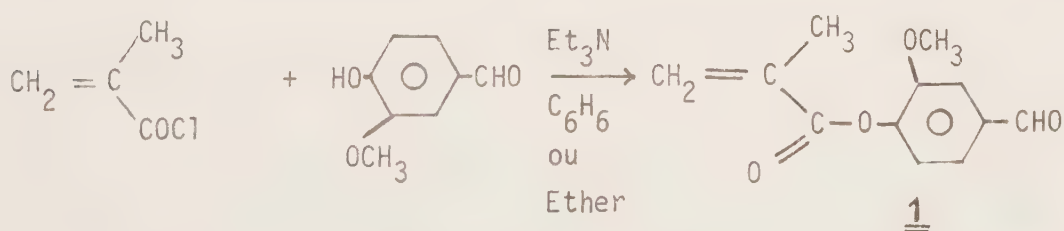


Il est à noter que deux types de polyaldéhydes aliphatiques ont été employés récemment pour l'immobilisation d'enzymes : un copolymère styrène-acroléine (1) et un polyacétal réticulé commercial donnant, par hydrolyse ménagée, des fonctions aldéhydes (2). Le premier donne des résultats satisfaisants ; le second nécessite une activation avant emploi, mais permet de moduler le pourcentage d'acétal transformé, donc de conserver un caractère hydrophile important ; les résultats décrits dans ce cas sont proches de ceux que nous avons obtenus avec la trypsine.

1) SYNTHESE DES POLYMERES

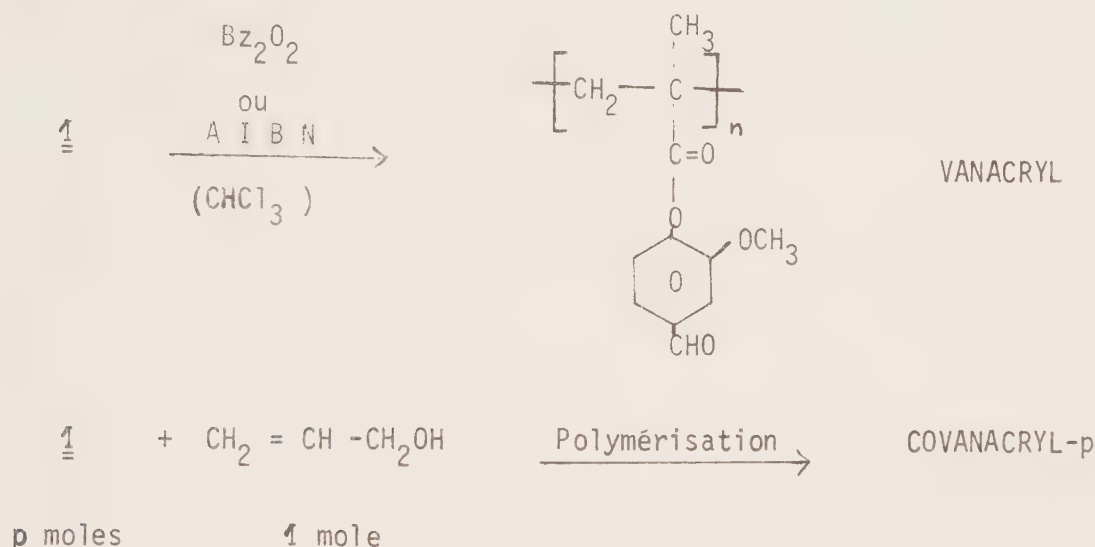
Polyméthacrylate de vanilline.

En traitant le chlorure de méthacrylyle par la vanilline du commerce, en présence de triéthylamine dans le benzène ou l'éther, on obtient le monomère 1 (Rdt 70 %) qui présente l'avantage d'être un solide blanc ($F = 56-58^\circ$), recristallisable dans l'éther de pétrole.



Nous avons également préparé l'ester 1 en faisant réagir le chlorure de méthacrylyle sur le sel de potassium de la vanilline dans l'éther mais le rendement observé est nettement moindre (40 %).

L'ester 1 a été soit polymérisé seul, soit copolymérisé avec l'alcool allylique, au moyen de peroxyde de benzoyle ou d'azobisisobutyronitrile (AIBN), dans le chloroforme au reflux pendant 24 heures :



Nous avons ainsi obtenu des solides blancs, l'homopolymère, appelé VANACRYL (Rdt 90 %) et les copolymères (ou COVANACRYLS-p, le chiffre p indiquant le nombre de moles de monomère 1 utilisées par mole d'alcool allylique dans la copolymérisation), ces copolymères étant obtenus avec des rendements variant de 40 à 70 %.

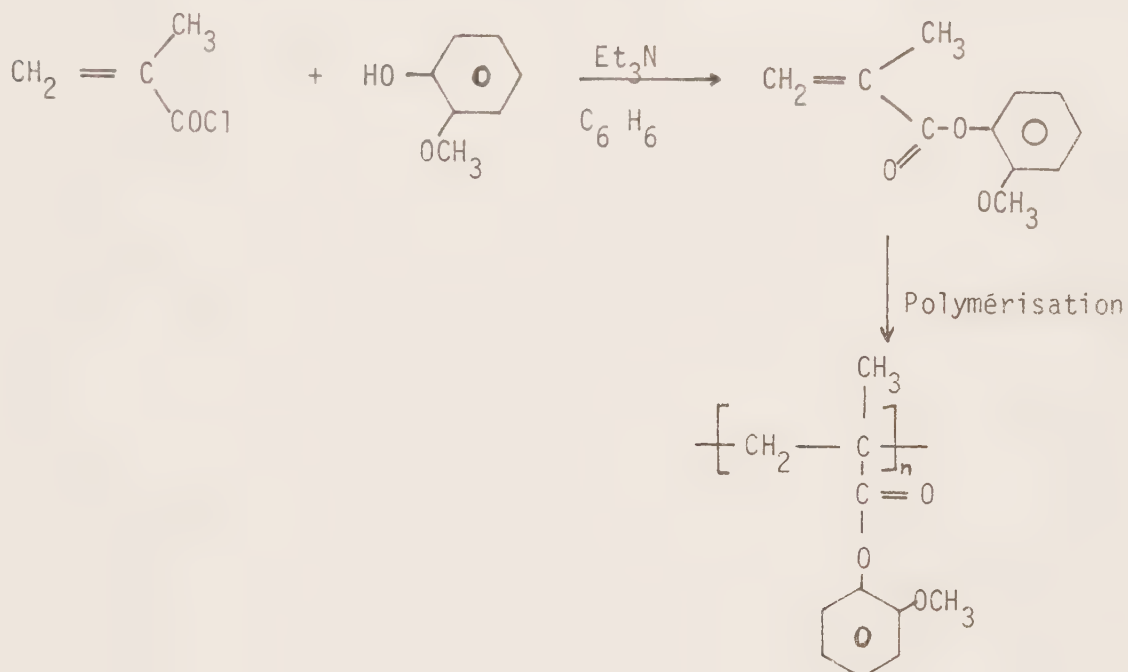
On sait que l'alcool allylique et le méthacrylate de méthyle ont tendance à donner des copolymères alternés (3 et 4) mais nous ne l'avons pas vérifié pour le Covanacryl-1. Du fait que les rapports entre les masses de méthacrylate de vanilline et d'alcool allylique sont en général supérieurs à 1, les divers copolymères présentent vraisemblablement une répartition statistique des motifs monomères sur la chaîne.

Polymérisation en suspension.

Nous avons d'autre part entrepris une polymérisation en suspension dans l'eau, en utilisant une solution concentrée de l'ester 1 dans le benzène (40 g dans 50 cm³ de solvant). Au bout de 3 heures, nous avons obtenu une suspension de perles dures de VANACRYL dont le diamètre était de l'ordre de quelques centaines de microns. La polymérisation était pratiquement quantitative. Des perles de mêmes diamètres des divers Covanacryls-p ont été préparées de la même façon et avec un rendement analogue, c'est-à-dire pratiquement quantitatif. On peut conserver ces perles à sec ou en suspension dans l'eau.

Polyméthacrylate de gaïacol.

Il nous a paru intéressant d'étudier la physisorption des enzymes protéolytiques sur des supports méthacryliques, structuralement semblables aux Vanacrils, mais dépourvus de groupements fonctionnels réactifs. Dans ce but, nous avons préparé le polyméthacrylate de gaïacol de la même façon que le Vanacryl, afin d'obtenir un polymère de tacticité et de degré de polymérisation comparables :



Il convient de noter qu'une préparation de ce polymère a déjà été décrite dans la littérature (5). L'estérification est catalysée par la soude et la polymérisation amorcée en tube scellé par le peroxyde de benzoyle.

2) ETUDE PHYSIQUE DES POLYMERES

Nous avons déterminé les masses moléculaires moyennes en nombre et les degrés de polymérisation des polymères précédents. Des courbes de chromatographie de gel (GPC) nous ont permis de connaître la répartition des masses des différentes chaînes composant chaque polymère. Enfin, nous avons fait une étude, en résonance magnétique nucléaire, de la tacticité des divers polymères pour juger de l'influence possible du volumineux groupement vanilline sur la stéréorégularité de l'enchaînement des maillons de la macromolécule.

Masse moléculaire moyenne et degré de polymérisation.

Nous avons mesuré la masse moléculaire moyenne en nombre des divers polymères en solution dans le chloroforme à 25° au moyen d'un osmomètre à membrane HEWLETT-PACKARD. Les masses moléculaires moyennes $\overline{M}_n$ observées varient de 24 500 à 54 000 et sont une fonction croissante de p . Les degrés de polymérisation varient de 148 à 279 et sont également une fonction croissante de p , sauf pour le Covanacryl-2.

Distribution de masses des polymères.

La répartition des masses des chaînes macromoléculaires, dans les différents échantillons synthétisés, a été étudiée au moyen d'un chromatographe de GPC WATERS ASSOCIATES. Les divers polymères (qui ont été étudiés en solution dans le tétrahydrofuranne) présentent tous une distribution statistique des masses. Les diagrammes de distribution sont des courbes en cloche plus ou moins aplaties selon les échantillons et qui présentent un léger épaulement vers les petites masses. L'examen de ces courbes montre que les masses moléculaires extrêmes sont voisines de 1000 et 100 000.

Ces polymères contiennent donc des molécules de faibles masses qui seraient susceptibles de fournir, lors de la fixation d'une enzyme, des combinaisons plus ou moins hydrosolubles et colloïdales. Cependant, nous n'avons rien remarqué de tel, même avec l'uréase qui a une masse moléculaire voisine de 480 000 (6).

Tacticité des polymères.

Les spectres de RMN de divers polyméthacrylates ont été étudiés en détail dans la littérature (7). Un examen détaillé des spectres obtenus au moyen d'un spectrographe THOMSON opérant à 250 MHz montre que les divers Vanacryls ont des tacticités sensiblement identiques, avec prédominance syndiotactique, un fort pourcentage d'enchaînements hétérotactiques et très peu d'enchaînements isotactiques. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (8 et 9) et sont analogues à ceux observés avec les poliodals que nous avons décrits récemment (7).

B. PREPARATION DE NOUVEAUX DERIVES INSOLUBLES DE LA TRYPSINE

De nombreuses combinaisons insolubles trypsine/support macromoléculaire ont été décrites dans la littérature (1,2 et 10). Les dérivés insolubles sont généralement plus stables que l'enzyme soluble originelle mais les taux de fixation peuvent être faibles et l'activité enzymatique spécifique résiduelle (AER) varie généralement de 0 à 43 % de celle de l'enzyme originelle. Par contre, on a décrit un dérivé (11) qui s'est montré plus actif que l'enzyme de départ. Sur le plan pratique, une trypsine insolubilisée pourrait être utilisée pour purifier un inhibiteur en solution par chromatographie d'affinité (12 et 13).

Nous avons décrit récemment (10 et 14) la préparation de dérivés insolubles de la trypsine par fixation, au moyen de liaisons covalentes, de l'enzyme sur un polyméthacrylate d'~~o~~-iodo-n-alcoyle (Poliodal). Ces dérivés présentaient une AER d'environ 30 % pour des taux de fixation variant de 26 à 36 mg d'enzyme par gramme de polymère.

Afin de préparer de nouveaux types de trypsine insolubilisée, nous nous sommes proposés d'utiliser, comme supports macromoléculaires réactifs, les polyméthacrylates de vanilline ou VANACRYLS.

Du fait de la grande fragilité et des propriétés particulières des enzymes, une telle réaction de fixation doit en principe être effectuée à froid et en milieu aqueux tamponné (15 et 16).

Préparation de trypsine insolubilisée.

Le greffage de trypsine lyophilisée sur le Vanacryl et sur les Covanacryls-1,2,3 et 5 a été réalisé en solution tampon phosphate à pH = 7,5 pendant 24 h à 2°, en utilisant 10 mg d'enzyme pour 100 mg de polymère (pré-alablement humidifié pendant 24 h) dans 5 cm³ de solution tampon. Nous avons obtenu dans chaque cas un dérivé insoluble facilement récupérable par filtration. Ce solide a été lavé avec une solution de chlorure de sodium M, puis avec de l'eau distillée, jusqu'à ce que la dernière eau de lavage ne présente plus d'activité enzymatique appréciable.

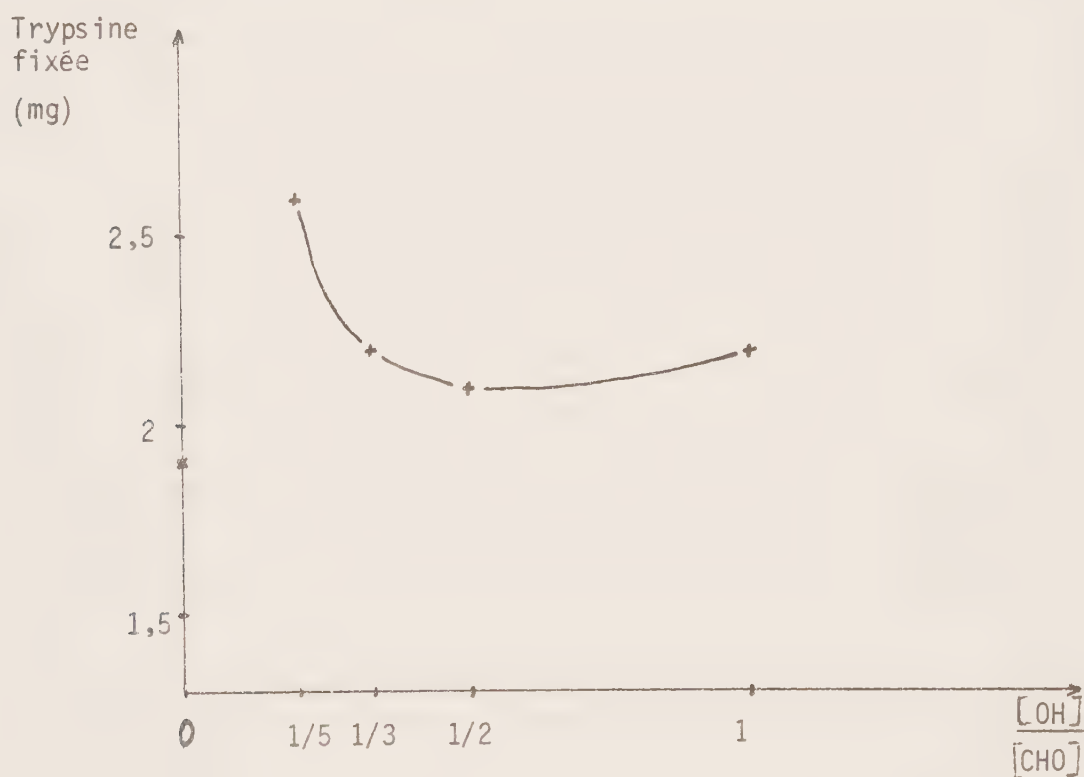
L'activité tryptique des dérivés insolubles a été mesurée avec un pH-stat (Radiometer) à pH 8 par titrage à la soude 0,1 N de l'acide carboxylique libéré par hydrolyse enzymatique d'un substrat de la trypsine, le chlorhydrate de N-benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) (17 et 18). Une courbe donnant la masse de substrat hydrolysé en 10 minutes, en fonction de la masse ^(de) trypsine, a permis de calculer la masse d'enzyme fixée sur le polymère et l'activité relative du dérivé insoluble par rapport à la trypsine originelle. Là encore, nous avons calculé la quantité d'enzyme fixée par la différence entre la masse totale mise en oeuvre (soit 10 mg) et la masse non fixée présente dans les filtrats. Cette masse d'enzyme non fixée a été évaluée par mesure de l'activité

trypsique du filtrat, dans les mêmes conditions que pour la trypsine originelle.

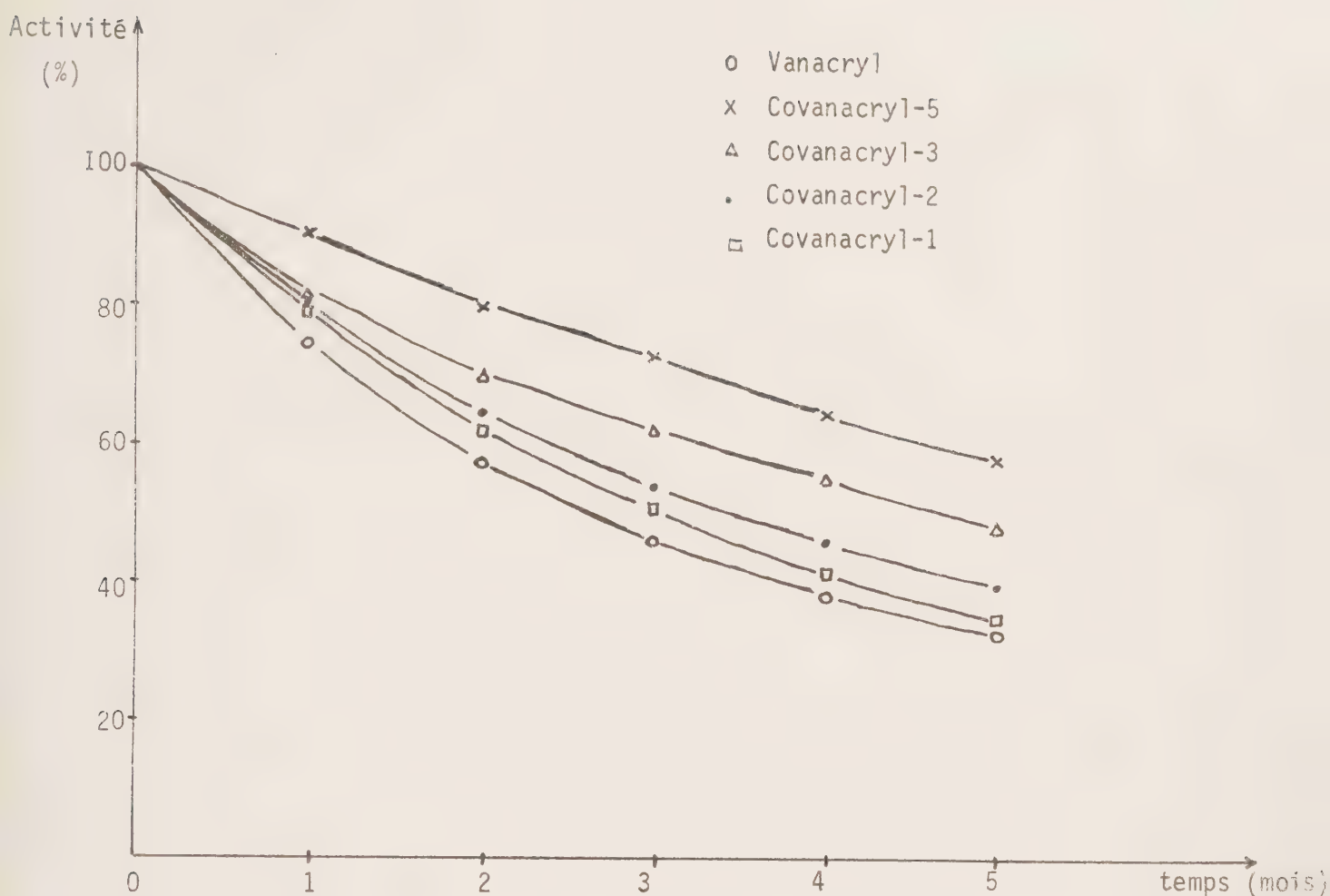
Un dosage par spectroscopie UV, avec la méthode de Folin (19), de la trypsine non fixée et présente dans les filtrats a fourni des résultats proches de ceux obtenus par la méthode ci-dessus.

Résultats obtenus :

La masse de trypsine fixée varie de 1,9 à 2,6 mg pour 100 mg de polymère et croît comme le nombre de groupements réactifs -CHO présents dans le copolymère ; à masse égale l'homopolymère fixe moins de trypsine que les copolymères : la présence des groupements hydroxyles favorise donc la fixation :



L'activité résiduelle des différents dérivés insolubles obtenus (et conservés en suspension dans une solution de tampon phosphate 0,01 M, pH 7,2) varie de 10 à 14 % de celle de la trypsine de départ. Les dérivés étant conservés en suspension dans 20 cm³ de la solution tampon phosphate à 2°, nous avons tracé des courbes d'activité qui indiquent qu'après 3 mois de stockage, ces mêmes dérivés présentaient encore de 45 à 73 % de leur activité initiale :

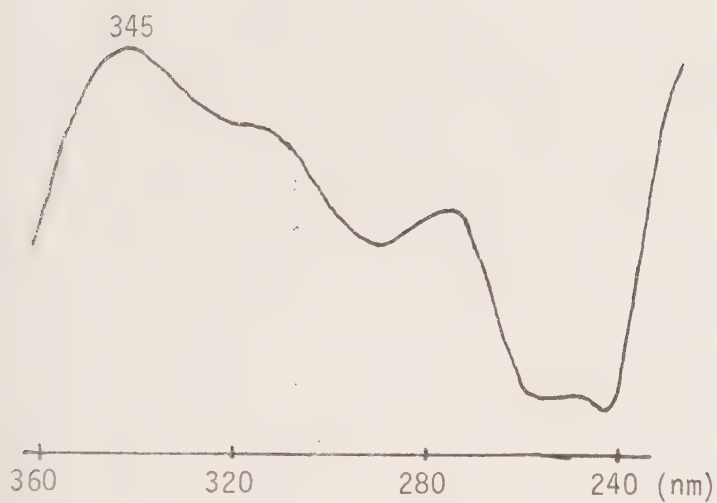


Il convient de noter ici que KATCHALSKI avait observé que ses dérivés insolubles de la trypsine, après conservation dans l'acide chlorhydrique 0,0025 N, gardaient encore 65 % de leur activité originelle au bout de 3 mois (17).

De toutes façons, il semble bien établi que les dérivés insolubles des enzymes sont beaucoup plus stables à l'état lyophilisé qu'en suspension (20 à 22) bien que la lyophilisation ou le séchage sous vide puissent parfois les désactiver partiellement ou totalement (23). Ainsi nos dérivés séchés sous vide et conservés secs se montraient moins actifs une fois remis en suspension que les mêmes dérivés conservés en suspension.

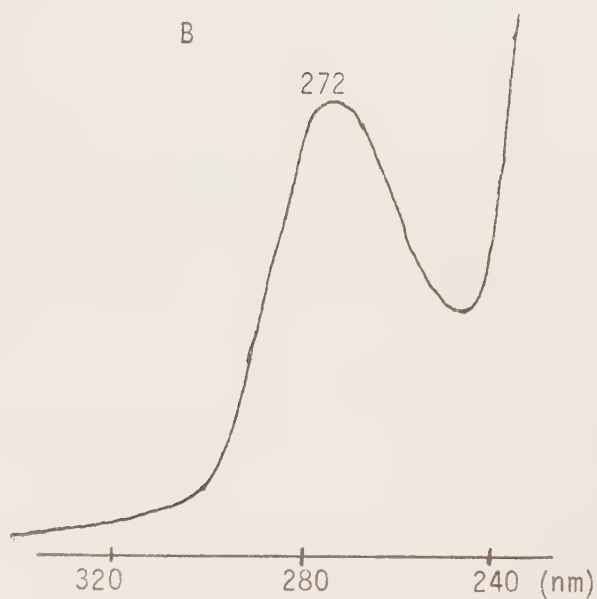
L'étude des spectres UV à pH 7,5 indique la présence, dans les filtrats après fixation, d'une très faible quantité (moins de 0,2 mg) de vanilline. En effet, le pic observé à 345 nm est nettement moins intense que celui correspondant à une solution de vanilline à 2 mg/l :

A



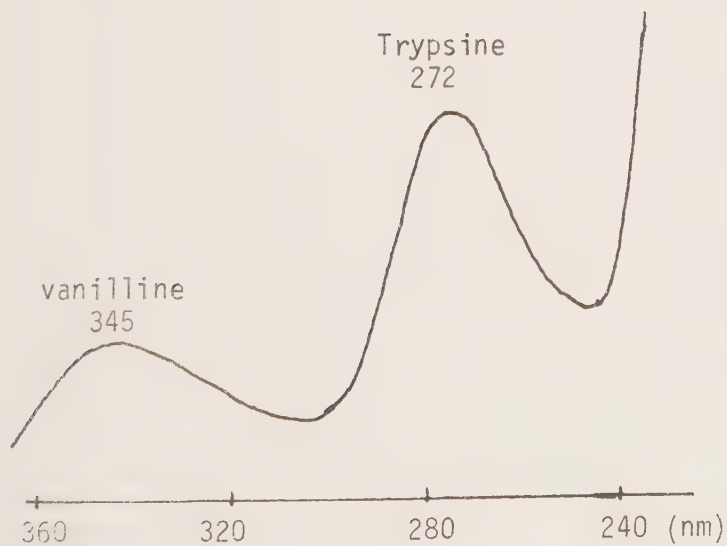
A. Vanilline à pH 7,5 (2 mg/l)

B



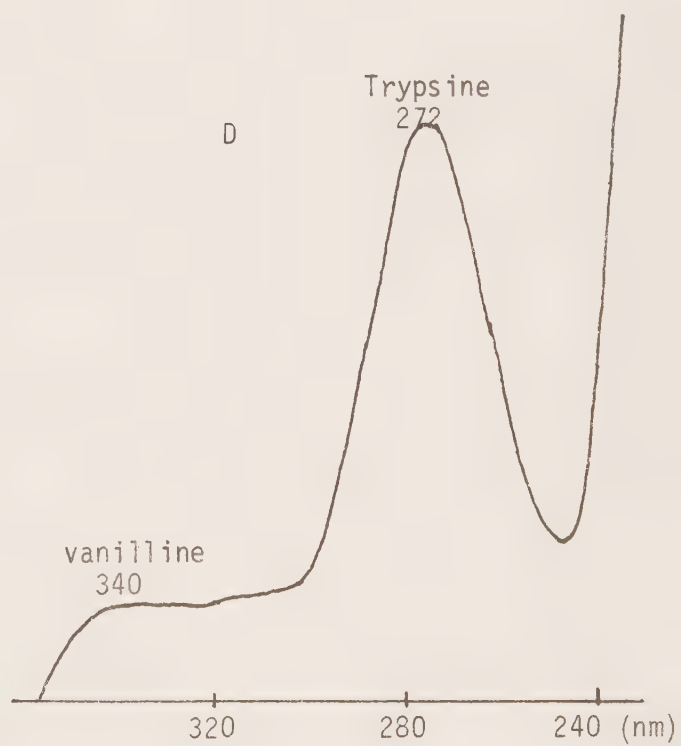
B. Trypsine à pH 7,5

C



C. Filtrat après fixation à pH 7,5

D



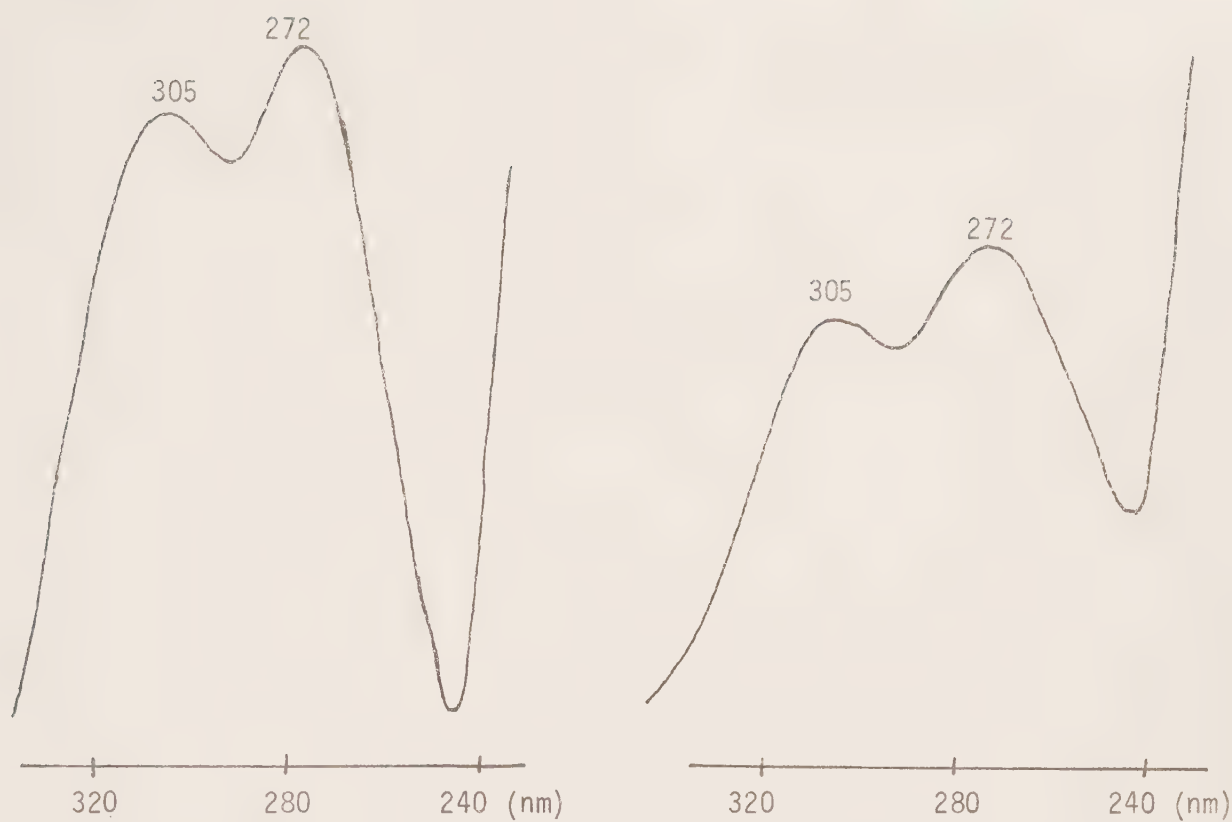
D. Trypsine (100 mg/l) + Vanilline
2mg/ l) à pH 7,5 (solution diluée)

La vanilline serait passée en solution vraisemblablement par hydrolyse basique (pH 7,5) de la fonction ester du polymère. Il ne peut s'agir de monomère resté occlus dans le polymère car le spectre UV du méthacrylate de vanilline est nettement différent :



méthacrylate de
vanilline à pH 7,5

Il semble que l'hydrolyse des fonctions ester des dérivés soit facilitée quand ces derniers sont conservés dans une solution M de KCl dans l'eau permutée ($\text{pH} < 7$). En effet, les spectres UV d'une solution de vanilline à pH 5 et du filtrat des dérivés maintenus en suspension pendant 48 heures, sont pratiquement identiques :

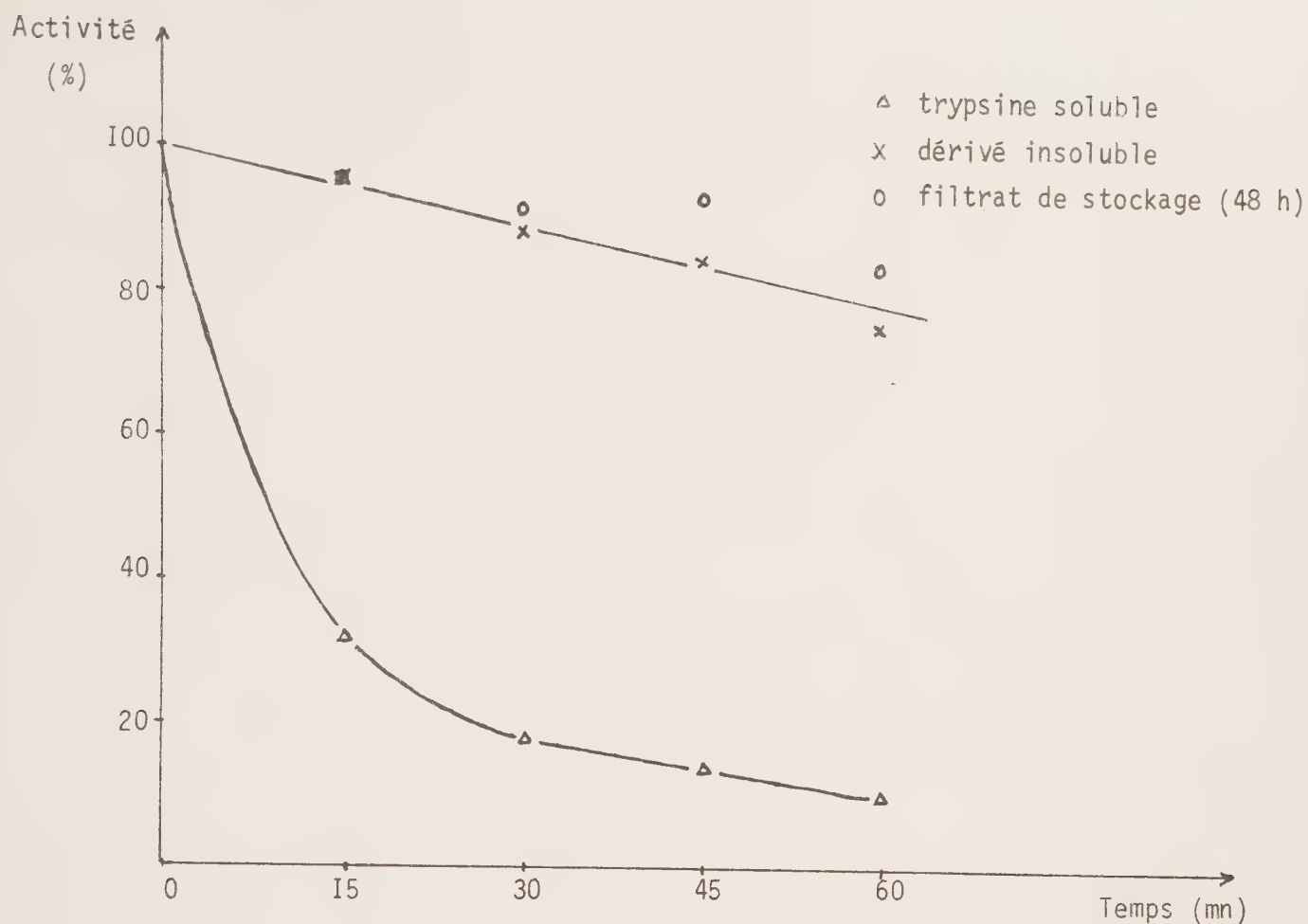


Vanilline à pH 5 (4 mg/l)

Filtrat après 48h de stockage dans
KCl, M (pH 5-6)

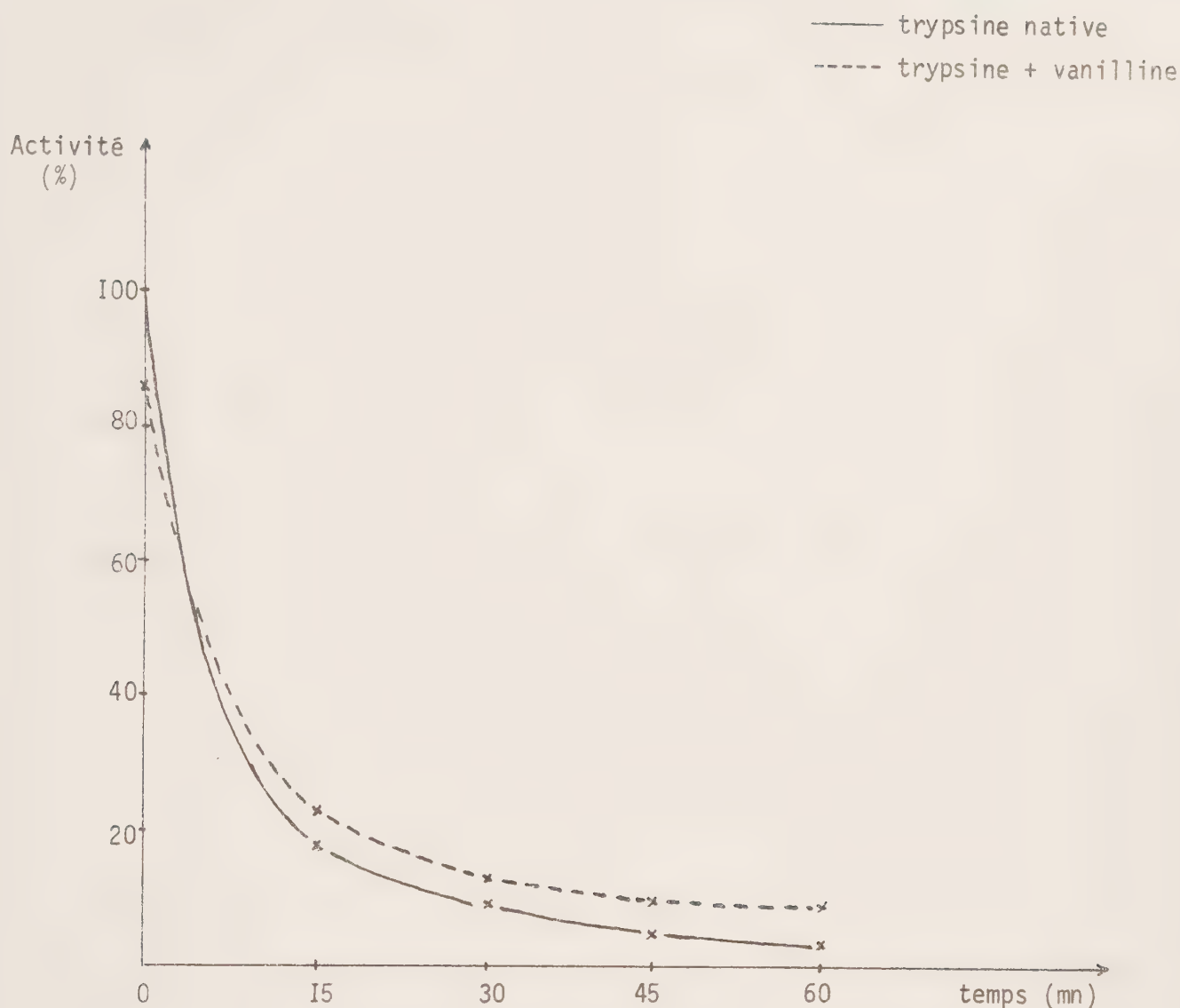
La mesure de l'activité résiduelle de l'enzyme après incubation à 55° montre que la trypsine native est fortement désactivée alors que le filtrat des dérivés, maintenus en suspension pendant 48 h à pH 5-6, est aussi peu désactivé que le dérivé insoluble lui-même dans des conditions analogues. Ce filtrat contient sensiblement les deux tiers de l'enzyme initialement fixée. Mis à part le fait déjà constaté (24) que la trypsine voit sa stabilité thermique augmenter par insolubilisation, nous observons donc également que la trypsine solubilisée en cours du stockage est thermiquement plus stable que la trypsine originelle.

En première analyse, on pourrait penser que la trypsine des filtrats de stockage est stabilisée par la vanilline restant fixée sur l'enzyme par liaison covalente après avoir été séparée du polymère par hydrolyse de la fonction ester. Disons en passant que cette hydrolyse des fonctions esters des chaînes latérales du Vanacryl peut très bien avoir été provoquée ou facilitée par la trypsine fixée.



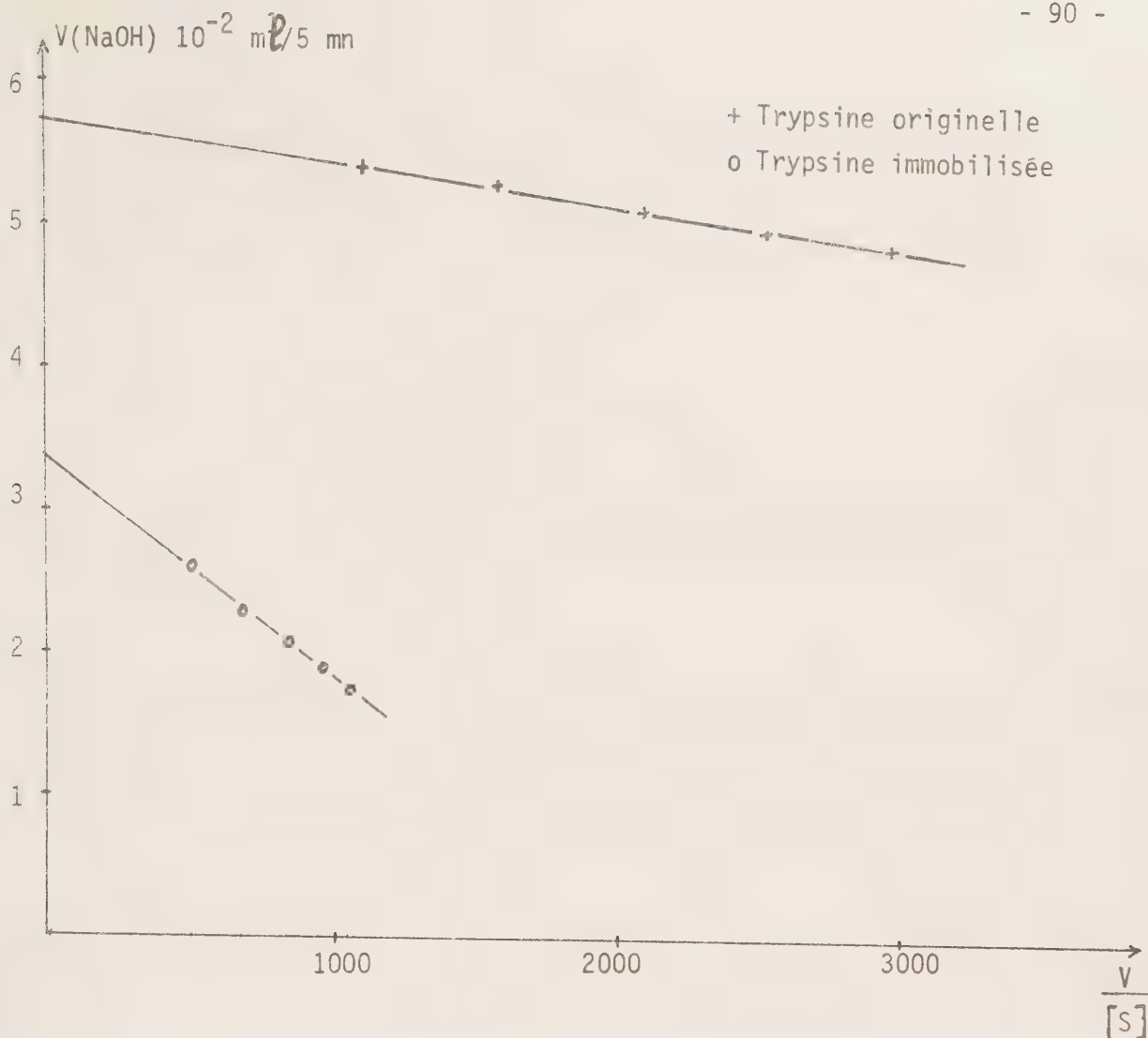
Incubation à 55°
 (trypsine de Worthington)

Afin d'étudier l'influence de la vanilline sur la stabilité thermique de la trypsine en solution, nous avons mis en présence 10 mg de trypsine (de Sochibo) et 100 mg de vanilline dans les conditions utilisées habituellement pour les insolubilisations (5 cm³ de solution tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5). Puis, après addition d'une solution de chlorure de sodium M et d'eau, nous avons incubé cette solution à 55° de la même manière que ci-dessus. Les courbes obtenues semblent indiquer que le peu de vanilline fixée désactive la trypsine lors de la fixation, mais que cette trypsine est alors un peu plus stable thermiquement que l'originelle :



Néanmoins la différence d'activité notée ici est si faible que l'on ne peut pas affirmer en toute certitude que la stabilité thermique, anormalement élevée, observée pour la trypsine des filtrats de stockage est seulement due à la formation d'une combinaison chimique entre cette enzyme et la vanilline.

Des études cinétiques ont montré que la fixation de la trypsine sur les Vanacryls entraîne une augmentation notable de la constante de Michaelis (K_m) qui passe de $2,7 \cdot 10^{-4}$ M à $1,6 \cdot 10^{-3}$ M (soit environ 6 fois plus) pour le Covanacryl-I :



Conclusion

La fixation sur les Vanacryls, de la trypsine par ses groupements basiques réactifs peut être effectuée comme sur les Poliiodals (10 et 14) mais avec de moins bons résultats. Les dérivés obtenus doivent être conservés en solution tampon basique car, en milieu acide, on observe une hydrolyse du polymère qui pourrait être catalysée par la trypsine.

Les dérivés obtenus sont stables à 55° et peuvent être conservés long temps en suspension à 2° mais leur affinité pour le substrat (BAEE) est environ 6 fois moindre que celle de la trypsine de départ.

Si on mesure l'activité trypsique d'un dérivé trypsine/Covanacryl-2 maintenu en suspension pendant 48 heures en solution acide, puis les activités trypsiques du filtrat correspondant et du dérivé remis en suspension, on remarque que les deux tiers environ de la trypsine fixée sont passés en solution, vraisemblablement par hydrolyse des fonctions esters du polymère. D'autre part, on retrouve dans le filtrat de stockage et la nouvelle suspension l'activité totale de la première suspension.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de la littérature (2) indiquant une fixation de la trypsine de 10 à 50 mg par gramme d'Enzacryl polyacétal (transformé par hydrolyse en polyaldéhyde). L'AER des dérivés n'est que de 16 à 25 % et là aussi il y a passage en solution d'une partie de l'enzyme fixée.

Nous remercions l'Institut Français du Caoutchouc pour les mesures de masses, la Société Rhône-Progil pour les courbes de GPC et la Société Thomson pour les spectres de RMN.

Nous remercions A. BONTE pour sa collaboration dans la synthèse des vanacryls (voir partie expérimentale).

P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

Dans la suite du texte, la pression réduite est désignée par l'abréviation PR, la température ambiante par TA, l'azobisisobutyronitrile par AIBN et le tétrahydrofurane par THF.

Le spectrographe de RMN utilisé pour l'étude de la tacticité des polymères était un appareil THOMSON opérant à 250 MHz.

Les courbes de GPC ont été obtenues avec un chromatographe de gel (GPC) WATERS-ASSOCIATES en utilisant le THF comme solvant.

A. PREPARATION DES VANACRYLS

Méthacrylate de vanilline (1)

Dans un réacteur d'un litre disposé dans un bain d'eau froide et muni de deux ampoules à rétablissement de pression, d'un réfrigérant et d'un agitateur mécanique, on introduit 45 g de vanilline dans 200 cm³ de benzène. Au mélange agité, on ajoute simultanément et goutte à goutte (2 heures) une solution de 30 g de chlorure de méthacrylyle (25 et 26) dans 100 cm³ de benzène et une solution de 30 g de triéthylamine dans 100 cm³ de benzène (27). On laisse réagir une nuit à température ambiante, filtre pour éliminer le précipité blanc de chlorhydrate de Et₃N et on lave le filtrat avec une solution saturée de NaHCO₃, puis avec de l'eau alternativement (deux fois). La phase benzénique est séparée, séchée (Na₂ SO₄ ou Mg SO₄), évaporée sous PR à TA et le solide blanc obtenu est séché puis recristallisé dans l'éther de pétrole. On obtient ainsi 46,5 g (Rdt 71 %) de "méthacrylate de vanilline" (solide blanc), F = 56-58°.

Analysé pour C₁₂ H₁₂ O₄.

Spectre IR (KBr) (Cm⁻¹) : $\nu_{(C=O)}$ 1730 et 1685 (FF) ; $\nu_{(C=C)}$ 1635 (F)

Spectre RMN (CDCl₃) (ppm) : δ 7,15 à 7,55 (m) (aire 3) (protons aromatiques) ;

δ 6,35 (m) (aire 1) (H vinylique) ;

δ 5,75 (m) (aire 1) (H vinylique) ;

δ 3,9 (s) (aire 3) (-O-CH₃) ;

δ 2 (s) (aire 3) (-CH₃) ;

δ 10 (s) (aire 1) (-CHO).

Avec les mêmes conditions opératoires, mais en utilisant l'éther comme solvant, on obtient l'ester 1 avec un rendement légèrement supérieur (80 %).

L'ester 1 a été également préparé par A. BONTE de la façon suivante :

Dans un ballon de 100 cm³ surmonté d'un réfrigérant, on introduit 50 cm³ de méthanol et 1,2 g de potassium lavé au benzène. Après 30 mn sous agitation magnétique, on ajoute lentement 4,6 g de vanilline, on poursuit l'agitation 1 h puis on évapore l'excès de méthanol (28). Le sel blanc obtenu est lavé au benzène puis séché sous vide. Dans un tricol de 500 cm³ disposé dans un bain de glace et muni d'une ampoule à rétablissement de pression, d'un réfrigérant et d'un agitateur mécanique, on introduit le sel de potassium précédent en solution dans 100 cm³ d'éther, puis, lentement (1 h), une solution de 2,6 cm³ de chlorure de méthacrylyle dans 10 cm³ d'éther. Après 1 h d'agitation, on filtre, sèche (Na₂SO₄), filtre à nouveau, lave deux fois avec une solution de NaHCO₃, puis à l'eau. Après séchage (MgSO₄) et évaporation de l'éther, puis recristallisation du résidu dans l'éther de pétrole, on obtient 4,5 g (Rdt 68 %) d'ester 1.

Polymérisation du "méthacrylate de vanilline".

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 40 cm³ de CHCl₃ pur, 6 g de "méthacrylate de vanilline" et 60 mg (1 %) d'AIBN (ou de peroxyde de benzoyle). On laisse 24 heures au reflux du CHCl₃. Le mélange est versé dans 200 cm³ de méthanol pour précipiter le polymère. Après filtration, mise en solution, reprécipitation puis séchage sous PR au dessiccateur, on obtient 5,4 g (90 %) de "polyméthacrylate de vanilline" (solide blanc), appelé VANACRYL.

Analyse (C₁₂ H₁₂ O₄)_n Calc % C 65,45 H 5,49 O 29,06
Tr 65,38 5,47 28,95

Spectre IR (cm⁻¹) (KBr) $\nu_{(C=O)}$ 1760 et 1705

(on n'observe rien aux environs de 1635 cm⁻¹) ;

Spectre RMN (CDCl₃) (ppm)

δ 10 (s) (aire 1) (-CHO)

δ 7,35(massif) (aire 3) (protons aromatiques)

δ 3,75(massif) (aire 3) (-OCH₃)

δ 2,35(massif) (aire 2) (-CH₂-de la chaîne macromoléculaire)

δ 1,5 (massif) (aire 3) (-CH₃)

A. BONTE a réalisé la polymérisation dans le benzène.

Copolymères de "méthacrylate de vanilline" et d'alcool allylique (COVANACRYL-5)

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 40 cm³ de chloroforme pur, 5,5 g ($\frac{5}{200}$ mole) de "méthacrylate de vanilline", 0,29 g ($\frac{1}{200}$ mole) d'alcool allylique et 60 mg (1%) d'AIBN (ou de peroxyde de benzoyle). On laisse 24 heures au reflux du benzène. Le mélange est ensuite versé dans 200 cm³ de méthanol pour précipiter le copolymère. Après filtration, mise en solution, reprécipitation puis séchage sous PR au dessiccateur, on obtient 3 g (52 %) de copolymère (solide blanc), appelé COVANACRYL-5.

Analyse Calc %	C 65,28	H 5,74	O 28,99
Tr	65,09	5,59	29,04

Spectre IR (Cm⁻¹) (KBr): $\nu_{(OH)}$ 3500 (F) ; $\nu_{(C=O)}$ 1755 et 1695
(on n'observe pas de $\nu_{(C=C)}$ aux environs de 1640 cm⁻¹).

On obtient de la même façon les COVANACRYLS-1,2 et 3.

Analyses

- <u>COVANACRYL-3</u>	Calc %	C 65,17	H 5,89	O 28,94
	Tr	65,08	5,77	28,97
- <u>COVANACRYL-2</u>	Calc %	C 65,05	H 6,07	O 28,88
	Tr	64,89	5,89	28,88
- <u>COVANACRYL-1</u>	Calc %	C 64,73	H 6,52	O 28,75
	Tr	64,76	6,71	28,51

Spectre RMN du COVANACRYL-1 (CDCl₃) (ppm)

- δ 10 (s) (aire 1) (-CHO)
- δ 7,3 (massif) (aire 3) (protons aromatiques)
- δ 3,75 (massif) (aire 4) (-OCH₃ et -OH allylique déplacé par l'acide trifluoracétique)
- δ 2,25 (massif) (aire 5) (-CH₂ - de la chaîne macromoléculaire)
- δ 1,7 (massif) (aire 3) (-CH₃).

"Polyméthacrylate de gaïacol"

Dans un réacteur d'un litre disposé dans un bain d'eau froide, et muni de deux ampoules à rétablissement de pression et d'un agitateur mécanique, on introduit 35 g de gaïacol dans 200 cm³ d'éther. Au mélange agité, on

on ajoute simultanément et goutte à goutte (2 h), une solution de 27 g de chlorure de méthacrylyle dans 100 cm³ d'éther et une solution de 27 g de triéthylamine dans 100 cm³ d'éther (27). On laisse réagir une nuit à TA, on filtre pour éliminer le précipité blanc de chlorhydrate de triéthylamine et on lave le filtrat avec une solution saturée de NaHCO₃, puis avec de l'eau alternativement (deux fois). La phase étherée est séparée, séchée (Na₂SO₄ ou MgSO₄), évaporée au rotavapor et le liquide incolore obtenu est distillé sous PR (Eb_{0,4} = 104-60). On obtient ainsi 40 g (74 %) de "méthacrylate de gaïacol" qui a donné les spectres et analyses attendus. La littérature indique Eb₄ = 109-10⁰.(5)

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 40 cm³ de CHCl₃ pur, 6 g de "méthacrylate de gaïacol" et 60 mg (1 %) d'AIBN. On laisse 24 h au reflux du CHCl₃. Le mélange est versé dans 200 cm³ de MeOH pour précipiter le polymère. Après séchage, mise en solution, reprécipitation puis séchage sous PR au dessiccateur, on obtient 4 g (66 %) de "polyméthacrylate de gaïacol" (solide blanc) qui a donné les spectres et analyses attendus (5).

Polymérisation en suspension du "méthacrylate de vanilline".

Dans un réacteur d'un litre disposé dans un bain d'huile et muni d'une ampoule à rétablissement de pression, d'un agitateur mécanique, d'un réfrigérant et d'un courant d'azote, on introduit sous agitation 187 cm³ d'eau distillée, 3 ml d'ammoniaque (densité 0,90) et 0,54 g de phosphate disodique. On ajoute lentement (1/2 h) une solution de 2,25 g de CaCl₂ dans 105 cm³ d'eau distillée. L'addition terminée, et tout en maintenant l'agitation, on chauffe à 70° puis on ajoute en 15 mn une solution de 40 g de "méthacrylate de vanilline" et 0,2 g d'AIBN dans 50 cm³ de benzène. Après 2 h d'agitation à 70°, on verse la suspension dans 500 cm³ d'eau. On neutralise avec HCl dilué, filtre,

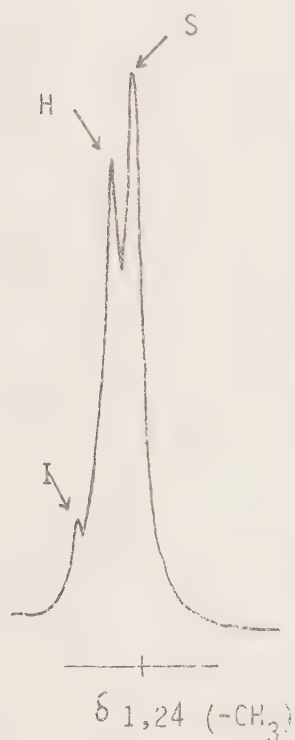
agite dans 400 cm³ de CCl₄ et 200 cm³ de méthanol pendant 3 h, filtre à nouveau, "lave" 3 h dans 500 cm³ d'eau, filtre et lave sur le filtre avec de l'eau en plusieurs fois. On obtient 39 g (97,5 %) de polymère sous forme de perles dures de plusieurs centaines de microns de diamètre. Ces billes sont conservées à sec ou en suspension dans l'eau.

On obtient de la même façon des perles dures des divers COVANACRYLS-p avec un rendement voisin de 100 %.

Tacticités comparées du VANACRYL, des COVANACRYLS et du polyméthacrylate de gaïacol.

La tacticité des polymères a été déterminée par étude en RMN des signaux correspondant aux $-CH_3$ en α des groupements carboxyliques et situés dans des enchaînements syndiotactiques (S), isotactiques (I) ou hétérotactiques (H). Les aires des différents pics n'ont pu être mesurées en raison d'un trop grand recouvrement mutuel, mais on peut néanmoins préciser - tous les échantillons étudiés présentent des spectres très semblables à celui indiqué ci-dessous - que les divers polymères ont des tacticités sensiblement identi-

ques, avec prédominance syndiotactique, un fort pourcentage d'enchaînements hétérotactiques et très peu d'enchaînements isotactiques. Ces résultats sont en accord avec la littérature (8 et 9)



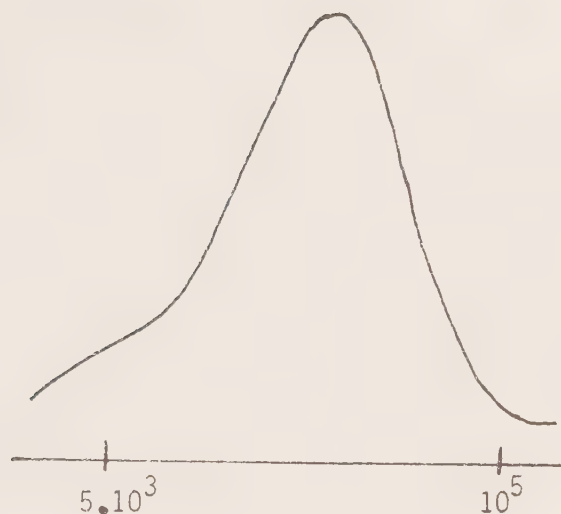
Remarque : les différents pics correspondant aux $-CH_2-$ en position β des groupements carboxyliques ou hydroxyles montrent également l'existence des trois types d'enchaînements, mais sont perturbés par la présence de DMSO- d_6 non complètement deutérié.

VANACRYL dans DMSO- d_6

Courbes de distribution des masses.

Ces courbes ont été obtenues en utilisant des solutions à 0,30 % de polymère dans le THF ; la colonne utilisée avait été étalonnée avec du polystyrène pour des molécules de masses comprises entre 1000 et 200 000.

On observe des courbes en cloche pratiquement symétriques pour tous les polymères étudiés, avec toutefois un léger épaulement.



Détermination de la masse moléculaire moyenne en nombre ($\overline{M}_n$) des différents échantillons par osmométrie dans le CHCl_3 à 25° .

Les mesures ont été faites sur des extraits séchés sous vide avant la mise en solution dans le CHCl_3 .

Résultats obtenus :

Polymère	$\overline{M}_n$	Degré de polymérisation moyen
VANACRYL	32 600	148
COVANACRYL-1	24 550	176
COVANACRYL-2	24 700	148
COVANACRYL-3	31 700	176
COVANACRYL-5	54 000	279
Polyméthacrylate de gaïacol	36 100	188

B. IMMOBILISATION DE LA TRYPSINE

Fixation de la trypsine sur les Vanacrils

On utilise le mode opératoire général suivant : dans une fiole conique de 25 cm^3 , on agite pendant 24 h à 2° une suspension de 100 mg de polymère dans 5 cm^3 de solution tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5. Puis on ajoute 10 mg de trypsine en maintenant l'agitation pendant encore 24 h, on filtre la suspension sur verre fritté (n° 3 de Prolabo). On lave plusieurs fois avec une solution de NaCl, M (total 50 cm^3) puis avec de l'eau distillée (total 45 cm^3) et les filtrats sont rassemblés (total 100 cm^3).

Après mesure de l'activité trypsique du dérivé insoluble obtenu, ce dernier est conservé en suspension dans 20 cm^3 de tampon phosphate 0,01 M à pH 7,2 ou dans 20 cm^3 de solution de KCl, M.

Mesure de l'activité de la trypsine originelle.

La trypsine originelle (de Worthington) est dosée dans les mêmes conditions que la trypsine présente dans les filtrats après fixation. On dissout 10 mg de trypsine dans 5 cm^3 de tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5, on laisse reposer 24 h à 2° , puis on ajoute 50 cm^3 de NaCl, M et 45 cm^3 d'eau distillée. On a ainsi 10 mg de trypsine dans 100 cm^3 de solution, appelée solution A. On place dans un vase thermostaté à 25° , $0,5\text{ cm}^3$ (soit $\frac{1}{200}$) de la solution d'enzyme précédente et $0,5\text{ cm}^3$ de solution A. On amène le pH à 8 puis on ajoute 2 cm^3 de solution 0,15 M de chlorhydrate de N-benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) et on note le volume de soude 0,1 N qu'il faut ajouter en 10 minutes pour maintenir le pH constant et égal à 8 (on utilise pour cela un pH-stat Radiometer). On recommence en prenant des volumes différents de la solution d'enzyme et de solution A (de façon que le volume total soit toujours de 1 cm^3), et on vérifie que le volume de soude ajouté est toujours proportionnel à la quantité d'enzyme mise en jeu :

Volume de solution de trypsine à 10 mg/100 cm ³ (cm ³)	Volume de Solution A (cm ³)	Masse de trypsine mise en jeu (mg)	Masse de trypsine en solution dans 100cm ³ de solution A (mg)	Volume de soude ajouté en 10 mn (cm ³)
0,5	0,5	0,05	10	0,1003
0,4	0,6	0,04	8	0,0801
0,3	0,7	0,03	6	0,0598
0,2	0,8	0,02	4	0,0400
0,1	0,9	0,01	2	0,0202



Mesure de l'activité de la trypsine non fixée et des combinaisons trypsine/support.

On opère comme pour les solutions étalons ci-dessus, avec soit $\frac{1}{200}$ de la solution d'enzyme non fixée, soit $\frac{1}{20}$ de la suspension de dérivé insoluble.

On appelle m_1 (mg) la masse de trypsine ayant la même activité que le dérivé insoluble, m_2 (mg) la masse de trypsine non fixée présente dans les filtrats et m_3 (mg) la masse de trypsine contenue dans le dérivé insoluble et obtenue par la différence $m_3 = (10 - m_2)$ mg. Dans ces conditions, le pourcentage d'activité résiduelle r du dérivé insoluble est donné par la relation $r = 100 \frac{m_1}{m_3}$. m_1 et m_2 sont déterminés à partir de la courbe précédente, connaissant le volume V de soude 0,1 N ajoutée en 10 minutes à 25°. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous dans lequel V (dérivé) et V (solution) représentent respectivement les volumes de soude ajoutés en 10 minutes lors des mesures des activités du dérivé insoluble et de la solution correspondante de trypsine résiduelle non fixée.

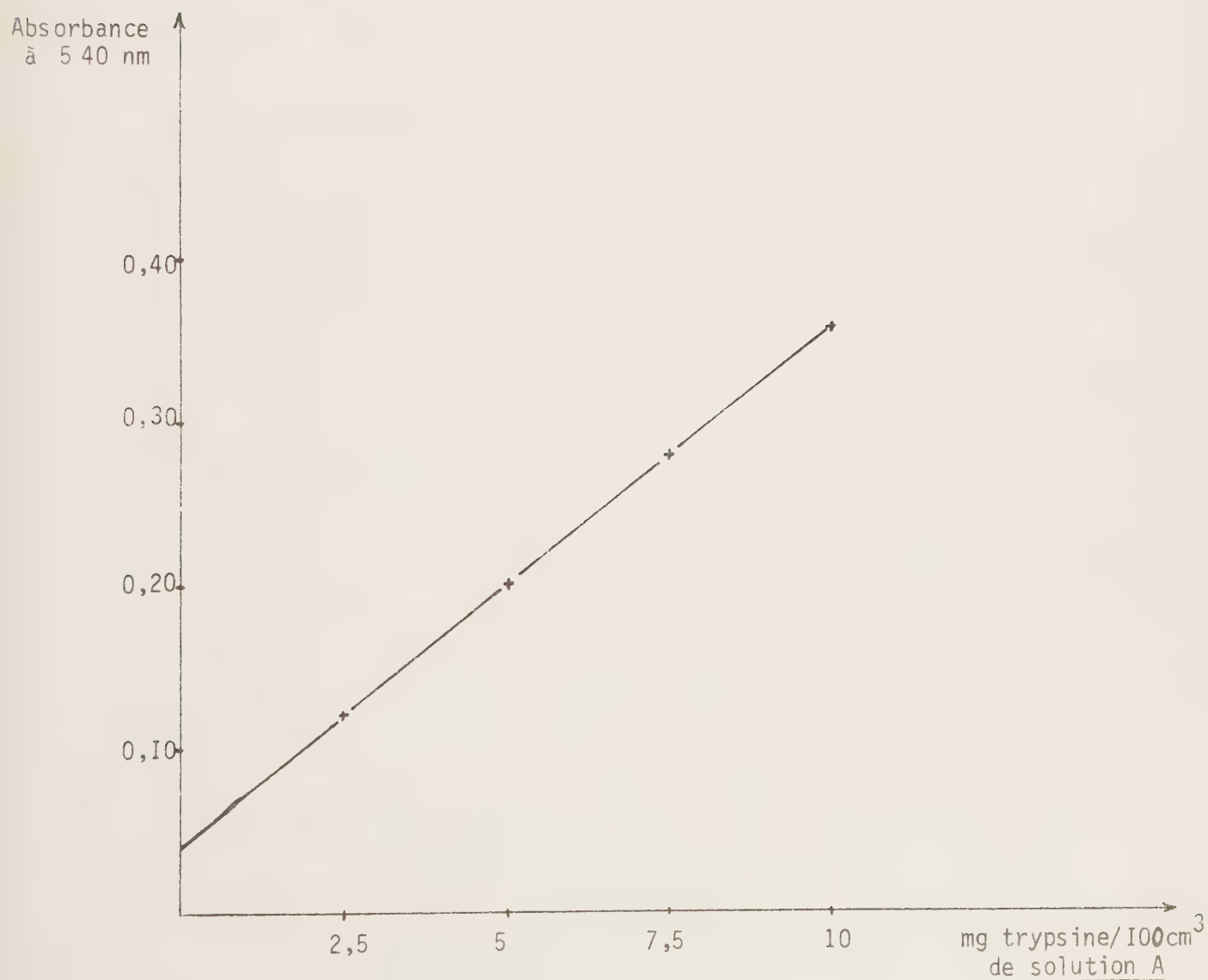
Polymère	V(solution) (cm ³)	V (dérivé) (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	m_3 (mg)	$r = 100 \frac{m_1}{m_3}$ (%)
VANACRYL	0,0811	0,0261	0,26	8,1	1,9	13,7
COVANACRYL-5	0,0740	0,0272	0,27	7,4	2,6	10,4
COVANACRYL-3	0,0782	0,0256	0,25	7,8	2,2	11,4
COVANACRYL-2	0,0790	0,0261	0,26	7,9	2,1	12,4
COVANACRYL-1	0,0781	0,0266	0,26	7,8	2,2	12,1

(Pour la courbe $m_3 = f \left[\frac{-OH}{-CHO} \right]$, voir partie théorique)

Dosage de la trypsine par le réactif de Folin.

Dans un tube à hémolyse, on place 0,4 cm³ de solution-étalon (10 mg de trypsine dans 100 cm³ de solution A), puis 2 cm³ de réactif C de Folin. (16). Après 10 minutes, on ajoute le plus rapidement possible 0,2 cm³ de réactif de Folin-Ciocalteu (29) ; après 30 minutes on dose l'absorbance UV sur un spectographe Beckmann à 540 nm. On trace une courbe-étalon en prenant diverses quantités de la solution-étalon d'enzyme : les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-après :

Volume de solution-étalon (cm ³)	Volume de solution A (cm ³)	Masse d'enzyme dans 100cm ³ (mg)	Absorbance
0,4	0	10	0,36
0,3	0,1	7,5	0,28
0,2	0,2	5	0,20
0,1	0,3	2,5	0,12



Pour les solutions de trypsine non fixée, on opère comme ci-dessus en prenant $0,4 \text{ cm}^3$ de solution et les masses d'enzyme en solution sont déterminées à partir de la courbe précédente :

Polymère	Absorbance	Masse d'enzyme non fixée (mg)
VANACRYL	0,30	8,1
COVANACRYL-5	0,28	7,5
COVANACRYL-3	0,2825	7,7
COVANACRYL-2	0,2875	8
COVANACRYL-1	0,2850	7,8

Ces résultats sont pratiquement identiques à ceux obtenus par mesure de l'activité trypsique des filtrats (voir ci-dessus).

Mesure de l'activité des dérivés insolubles conservés à pH 7,2.

Les dérivés insolubles obtenus sont mis en suspension dans 20 cm^3 de tampon phosphate $0,01 \text{ M}$ à pH 7,2 et 2° . Tous les mois, on agite les suspensions une heure à 25° puis on en dose l'activité trypsique comme ci-dessus en utilisant 1 cm^3 (soit $\frac{1}{20}$) de la suspension dans le pH-stat.

Dans le tableau ci-dessous, on donne pour chaque dérivé insoluble le pourcentage d'activité (en fonction du temps de stockage) par rapport à l'activité du même dérivé au temps initial.

Polymère	Activité (%)				
	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois
VANACRYL	75	58	46	38	33
COVANACRYL-5	92	80	73	65	58
COVANACRYL-3	81	70	62	56	48
COVANACRYL-2	75	62	54	46	40
COVANACRYL-1	75	65	51	42	35

(Pour la courbe activité = f (t), voir partie théorique)

Remarque : ces dérivés n'ont pas été filtrés : on ne peut savoir si la trypsine fixée est passée en solution, les mesures portant sur l'ensemble dérivé insoluble + solution.

Activité après incubation à 55°.

a) Trypsine de Worthington :

On filtre une suspension de dérivé de Covanacryl-2 conservé 48 heures à 2° dans 20 cm³ de solution de KCl, M. On récupère le filtrat et le dérivé est remis aussitôt en suspension dans 20 cm³ d'une solution identique à la précédente. On dose, comme précédemment, à 25 ° avec le pH-stat, l'activité d'une solution-étalon de trypsine (10 mg dans 100 cm³ de solution A), du filtrat précédent et de la nouvelle suspension. Puis on incube ces trois mélanges à 55° pendant une heure. Toutes les 15 minutes on prélève à la pipette 0,5 cm³ de solution de 1 cm³ de suspension dont on dose l'activité trypsique par la méthode habituelle.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Mélange étudié	Activité après incubation à 55° (%)				
	Temps (mn)				
	0	15	30	45	60
Solution-étalon de trypsine	100	32	18	14	10
Filtrat de stockage	100	96	92	94	84
Suspension de dérivé	100	96	89	85	76

(Pour les courbes Activité = f(t) voir partie théorique)

Le dérivé et le filtrat de stockage présentent donc sensiblement la même stabilité thermique.

b) Trypsine de Sochibo :

Dans une fiole conique de 25 cm³ on place 10 mg de trypsine et 100 mg de vanilline en solution dans 5 cm³ de tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5. Après 24 heures d'agitation à 2° on ajoute 50 cm³ de solution de NaCl, M et 45 cm³ d'eau. On prépare de la même façon une solution-étalon de 10 mg de trypsine dans 100 cm³ de solution A puis on dose l'activité trypsique de ces deux solutions comme ci-dessus pour l'incubation à 55°.

	Activité par rapport à la solution-étalon (%)				
	Temps (mn)				
	0	15	30	45	60
Solution-étalon	100	18	9	5	3
Solution trypsine + vanilline	86	23	13	10	9

(Pour les courbes activité = f(t) voir partie théorique)

Mesure de l'activité des dérivés conservés dans KCl

Après 48 heures de stockage à 2° on mesure l'activité trypsique d'un dérivé de covanacryl-2 par la méthode habituelle. Puis on filtre ce dérivé, on récupère le filtrat et on fait une nouvelle suspension du dérivé dans KCl, M. On dose l'activité trypsique du filtrat et de la nouvelle suspension :

Volume de soude ajouté pour :

- 1) la suspension de stockage : 0,0185 cm³ ;
- 2) le filtrat : 0,0112 cm³ ;
- 3) la nouvelle suspension : 0,085 cm³ .

Mesure du Km.

On prépare des solutions diluées de BAEE (substrat), tamponnées à pH 8, et on mesure l'activité trypsique de la solution-étalon de trypsine et d'un dérivé de Covanacryl-1 vis-à-vis de ces solutions de substrat, dans les conditions habituelles :

Substrat [S] (Mole/l)	Solution-étalon		Dérivé	
	Volume V de soude ajouté (cm ³)	$\frac{V}{[S]} \times 10^{-2}$	Volume V de soude ajouté (cm ³)	$\frac{V}{[S]} \times 10^{-2}$
$0,15 \times \frac{1}{30}$	0,0542	1084	0,0260	520
$0,15 \times \frac{1}{45}$	0,0530	1590	0,0230	690
$0,15 \times \frac{1}{60}$	0,0515	2060	0,0207	830
$0,15 \times \frac{1}{75}$	0,0500	2500	0,0190	950
$0,15 \times \frac{1}{90}$	0,0490	2940	0,0175	1050

(Pour les courbes $V = f\left[\frac{V}{[S]}\right]$, voir partie théorique).

La constante de Michaelis K_m est la pente de ces courbes.

On obtient les résultats suivants :

a) pour la solution-étalon : $K_m = 0,27 \text{ mM}$

b) pour le dérivé insoluble : $K_m = 1,6 \text{ mM}$

B I B L I O G R A P H I E

- 1) P.S. FORGIONE, Brevet allemand n° 2 104 810, 19 août 1971 ; Chem. Abstr., 1972, 76, II 590 n.
- 2) R. EPTON, J.V. Mc LAREN et T.H. THOMAS, Biochem. J., 1971, 123 (4), 21 P.
- 3) E.C. CHAPIN et R.F. SMITH, Brevet américain n° 2 817 651, 24 déc. 1957; Chem. Abstr., 1958, 52, 5888 a.
- 4) P.K. SENGUPTA, A.R. MUKHERJEE et P. GHOSH, J. Macromol. Chem., 1966, I (3), 481.
- 5) M.M. KOTON, T.A. SOKOLOVA, M.N. SAVITSKAYA et T.M. KISELEVA, Zhur. Obshchei Khim., 1958, 28, 417.
- 6) E.J. DEVELLEZ et D.R. JOHNSON, Comp. Biochem. Physiol., 1968, 24 (2), 661.
- 7) E. BROWN, A. RACOIS et H. GUENIFFEY, Bull. Soc. Chim., 1971 (12), 4341 et références citées.
- 8) F.A. BOVEY et G.V.D. TIERS, J. Polymer Sci., 1960, 44, 173.
- 9) K. MATSUZAKI, T. URYU et K. ITO, Makromol. Chem., 1969, 126, 292.
- 10) E. BROWN et A. RACOIS, Bull. Soc. Chim., 1971, 12, 4351 (et références citées).
- 11) E.B. ONG, Y. TSANG et G.E. PERLMANN, J. Biol. Chem., 1966, 241, 5661.
- 12) N. FORNSTEDT, L. SONDBERG, G. EKLUND, R. AXEN et J.O. PORATH, Brevet allemand n° 2 102 514, 29 Juillet 1971 ; Chem. Abstr., 1971, 75, 105 551 g.
- 13) G.W. JAMESON et D.T. ELMORE, Biochem. J., 1971, 124 (5), 66.
- 14) E. BROWN et A. RACOIS, Tetrahedron Letters, 1971 (15), 1047.
- 15) I.H. SILMAN et E. KATCHALSKI, Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, part. II, 873.
- 16) H.R. MANLER et E.H. CORDES, Biological Chemistry, Harper et Row, London, 1967, p. 12.
- 17) A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1963, 238, 1689.
- 18) C.E. Mc DONALD et A.K. BALLS, J. Biol. Chem., 1957, 229, 69.
- 19) O.W. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
- 20) M.A. MITZ et L.J. SUMMARIA, Nature, 1961, 189, 576.
- 21) R. AXEN et J. PORATH, Nature, 1966, 210, 367.
- 22) J. GRYSZKIEWICZ, Folia Biologica, 1971, 19, 119.
- 23) L. GOLDSTEIN, M. PECHT, S. BLUMBERG, D. ATLAS et Y. LEVIN, Biochemistry, 1970, 9 (II), 2322.

- 24) W. BRUMMER, N. HENNRICH, M. KLOCKOW, H. LANG et H.D. ORTH, Europ. J. Biochem., 1972, 25, 129.
- 25) I.A. ARBUZOVA, L.J. MEDVEDEVA et S.A. PLOTKINA, Zhur. Obshcheikhim., 1956, 26, 1127.
- 26) J. HEYBOER et A.J. STAVERMAN, Rec. Trav. Chim., 1950, 69, 791.
- 27) E.L. MARTIN, Brevet américain n° 2 929 710, 22 mars 1960 ; Chem. Abstr., 1960, 54, 12 850.
- 28) M. RINGSDORF et G. GREBER, Makromol. Chem., 1959, 31, 27.
- 29) O. FOLIN et V. CIOCALTEU, J. Biol. Chem., 1927, 73, 627.

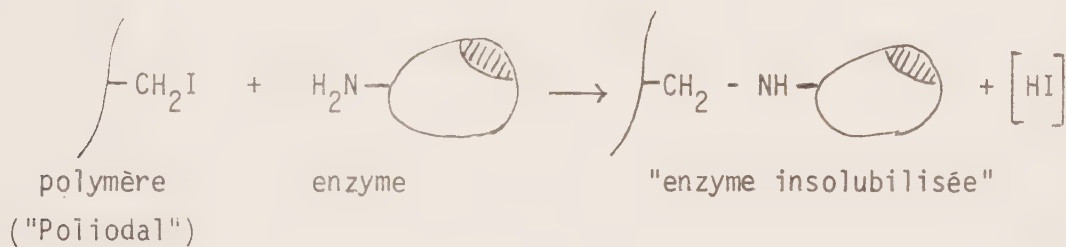
EMPLOI DES VANACRYLS DANS LA PREPARATION
DE NOUVEAUX DERIVES INSOLUBLES
DE L'UREASE

I. INTRODUCTION

Un certain nombre de combinaisons insolubles uréase/support macromoléculaire sont actuellement connues (1 à 6). Dans plusieurs cas, le support macromoléculaire possède des groupements diazoïques (1 à 3) qui réagissent sur les cycles phénoliques de la tyrosine contenue dans l'enzyme selon une réaction de copulation classique.

Ces dérivés insolubles contiennent de 15 à 60 mg d'enzyme pour 100 mg de support et l'activité enzymatique résiduelle est la moitié de celle de l'uréase initiale (1).

En ce qui nous concerne, nous avons décrit (4 et 5) un nouveau type d'uréase immobilisée, obtenue en faisant réagir cette enzyme sur des polyméthacrylates d' ω -iodo n -alcôyle (Poliiodals) selon le schéma probable suivant :



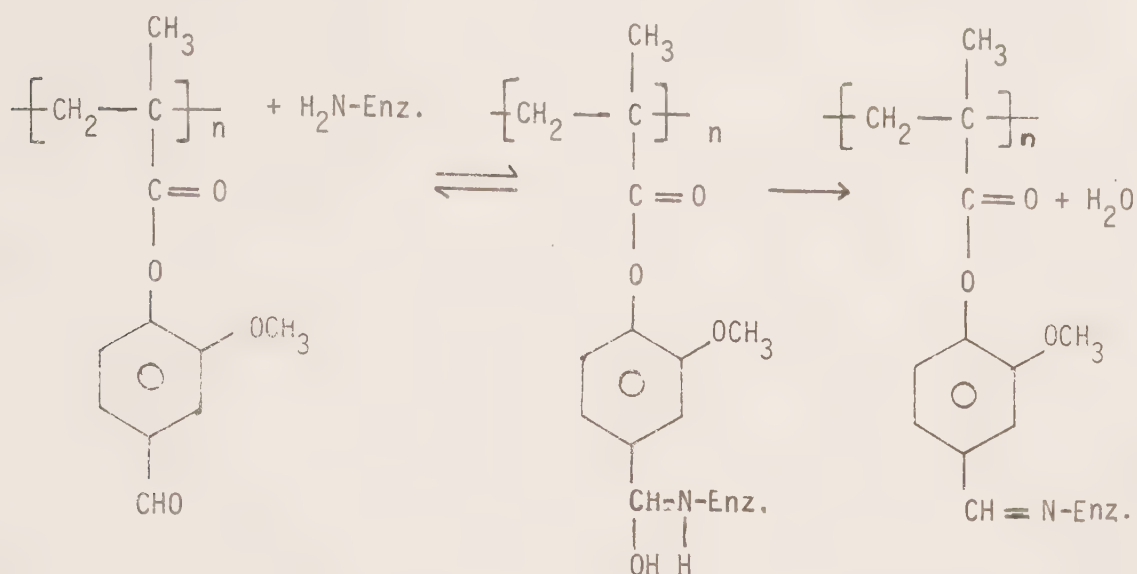
En utilisant 50 mg d'enzyme pour un gramme de polymère, nous avons obtenu des fixations de 10 à 15 mg d'uréase, l'activité enzymatique résiduelle (AER dans la suite) variant suivant les cas de 25 à 75 % de l'activité spécifique originelle.

L'uréase a également été enfermée dans de petites capsules semiperméables de polystyrène, d'éthylcellulose ou de silicones. L'activité résiduelle des combinaisons ainsi obtenues est environ le sixième de celle de l'uréase initiale utilisée (6). On a souligné récemment l'intérêt que pouvait présenter une uréase immobilisée, notamment dans la construction des reins artificiels (7) et dans le dosage en continu de l'urée (1).

II. LE PRESENT TRAVAIL

Dans le but de préparer d'autres types d'enzymes insolubilisées, nous nous sommes proposé d'utiliser des supports macromoléculaires différents de ceux utilisés jusqu'à présent et dont nous avons déjà indiqué les préparations (8). Ces polymères sont des polyméthacrylates de vanilline (VANACRYLS) ou des copolymères de méthacrylate de vanilline et d'alcool allylique (COVANACRYLS). Ils comportent par conséquent des chaînes latérales

terminées par des groupements aldéhydes aromatiques susceptibles de réagir avec les groupements -NH_2 libres des enzymes suivant le schéma probable :



Dans la suite du texte, les copolymères utilisés seront désignés sous les noms de COVANACRYLS-1,2,3 et 5 respectivement, les derniers chiffres indiquant le nombre de moles de "méthacrylate de vanilline" utilisées par mole d'alcool allylique dans la préparation du copolymère.

Du fait de la fragilité et des propriétés particulières des enzymes, leur greffage sur les polymères doit en principe être effectué à froid et en milieu aqueux tamponné (9 à 11). La réaction de fixation ne doit pas amener de modification chimique des sites actifs de l'enzyme (par alcoylation, etc...) car ceci entraînerait leur totale destruction (9 et 12). En ce qui concerne les VANACRYLS, on peut s'attendre à ce que leurs groupements aldéhydes réagissent de façon spécifique avec les fonctions NH_2 libres des enzymes, lesquelles fonctions ne sont généralement pas indispensables à l'activité enzymatique (13).

Préparation d'uréase insolubilisée

Nous avons fait réagir l'uréase sur le VANACRYL et les COVANACRYLS en solution tampon phosphate 0,2 M à pH = 7,5. Après un temps de fixation de 24 h, les dérivés insolubles obtenus ont été lavés avec une solution M de NaCl puis avec de l'eau (jusqu'à ce que le dernier filtrat ne présente plus d'activité enzymatique décelable) et enfin conservés à froid soit à l'état sec, soit en suspension dans l'eau distillée.

Mesure de l'activité des combinaisons insolubles uréase-support

L'activité de ces dérivés insolubles de l'uréase a été mesurée par dosage colorimétrique du carbonate d'ammonium formé par hydrolyse enzy-

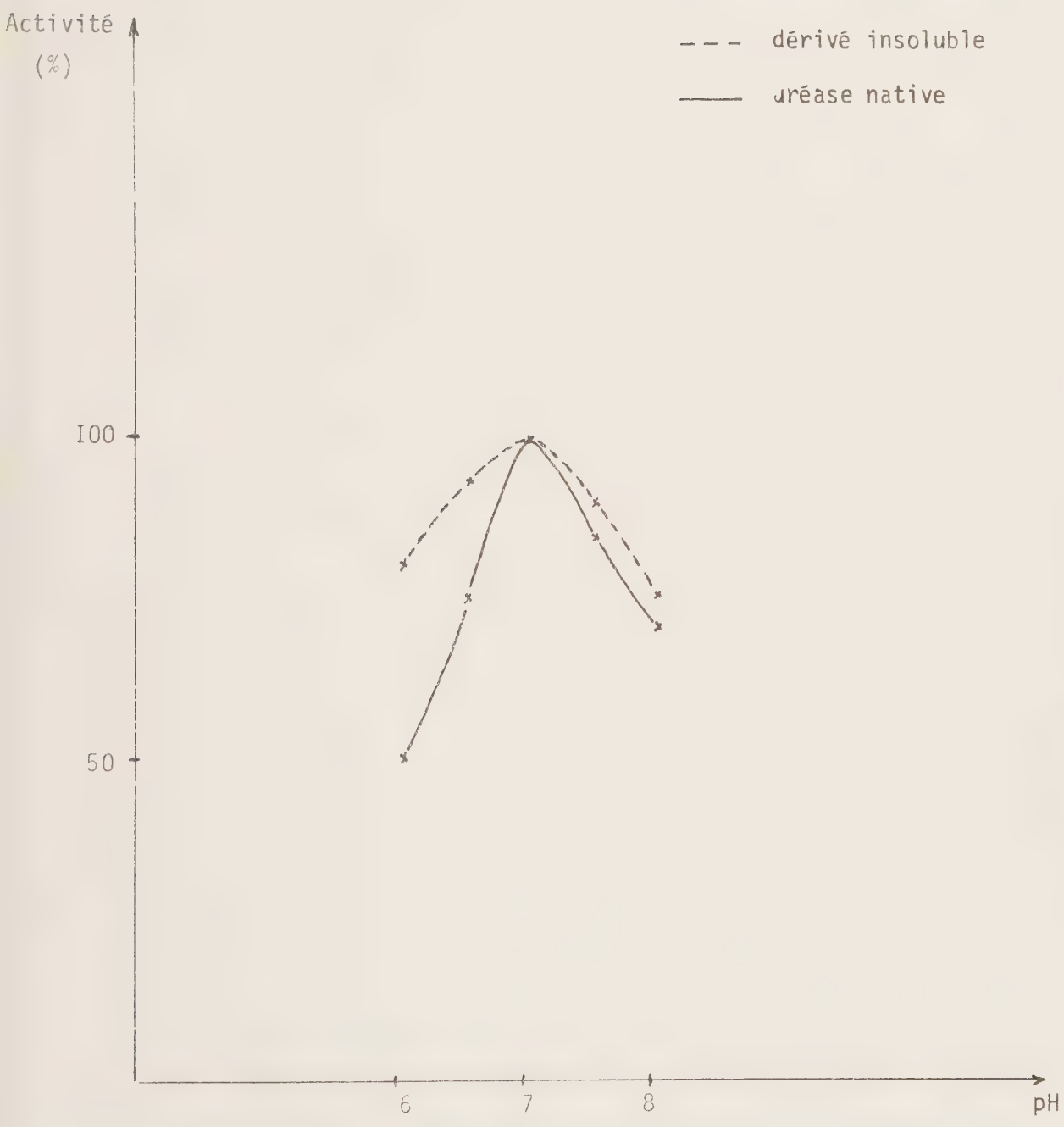
matique de l'urée. Le mode opératoire que nous avons utilisé était invariablement le suivant : on agite pendant 5 minutes une suspension du dérivé insoluble uréase-support dans une solution tamponnée d'urée puis on élimine le polymère par filtration. Après traitement de la solution par du réactif de Nessler, on note l'absorption du mélange jaune obtenu à la longueur d'onde de 490 nm (spectrophotomètre Beckmann) (I4).

Une courbe d'étalonnage de l'activité enzymatique en fonction de sa masse a été tracée (voir partie expérimentale) pour l'uréase initiale dans des conditions opératoires identiques à celles utilisées pour ses dérivés insolubles, ce qui a permis de calculer la masse m_1 d'uréase pure ayant la même activité que le dérivé insoluble. La masse m_2 d'uréase non fixée sur le polymère et présente dans les filtrats a été déterminée par incubation avec une solution d'urée dans les mêmes conditions que l'uréase pure. Pour calculer m_2 , nous avons admis que l'uréase des filtrats avait conservé son activité originelle. La masse m_3 d'uréase fixée sur le polymère est donnée par la différence $m_3 = m_0 - m_2$, m_0 représentant la quantité d'uréase mise en présence du polymère en vue du greffage. L'activité relative r du dérivé uréase-support vis-à-vis de l'uréase de départ est donnée par le rapport $r = m_1/m_3$. Les masses m_0 d'uréase utilisée pour la fixation étaient de 10 mg pour 100 mg de polymère sec ou préalablement "humidifié" dans le tampon phosphate.

Nous avons constaté que pour un même support macromoléculaire, la masse d'enzyme fixée est sensiblement la même, que le polymère utilisé soit sec ou préalablement humidifié dans la solution tampon phosphate. Par contre l'activité enzymatique résiduelle (AER dans la suite du texte) des dérivés obtenus est nettement plus importante quand ceux-ci sont conservés en suspension dans l'eau plutôt qu'à l'état sec. Après avoir été maintenus en suspension dans l'eau pendant 8 jours, les dérivés avaient sensiblement la même activité que lors de leur préparation. Une étude comparée de la fixation de l'uréase sur le VANACRYL et sur les COVANACRYLS a montré que la masse d'enzyme fixée était plus élevée pour les copolymères que pour l'homopolymère, mais qu'elle diminuait en même temps que le nombre de groupements aldéhydes. De plus l'AER des combinaisons obtenues à partir des copolymères était plus élevée que celle des dérivés de l'homopolymère, sans que cette AER soit d'ailleurs fonction du nombre de groupements hydroxyles.

Nous avons mesuré l'activité de l'uréase initiale et celle d'une combinaison uréase-support en fonction du pH, ce qui a conduit à tracer deux courbes en cloche indiquant une activité maximale à pH = 7, avec une activité

plus grande du dérivé quel que soit le pH :



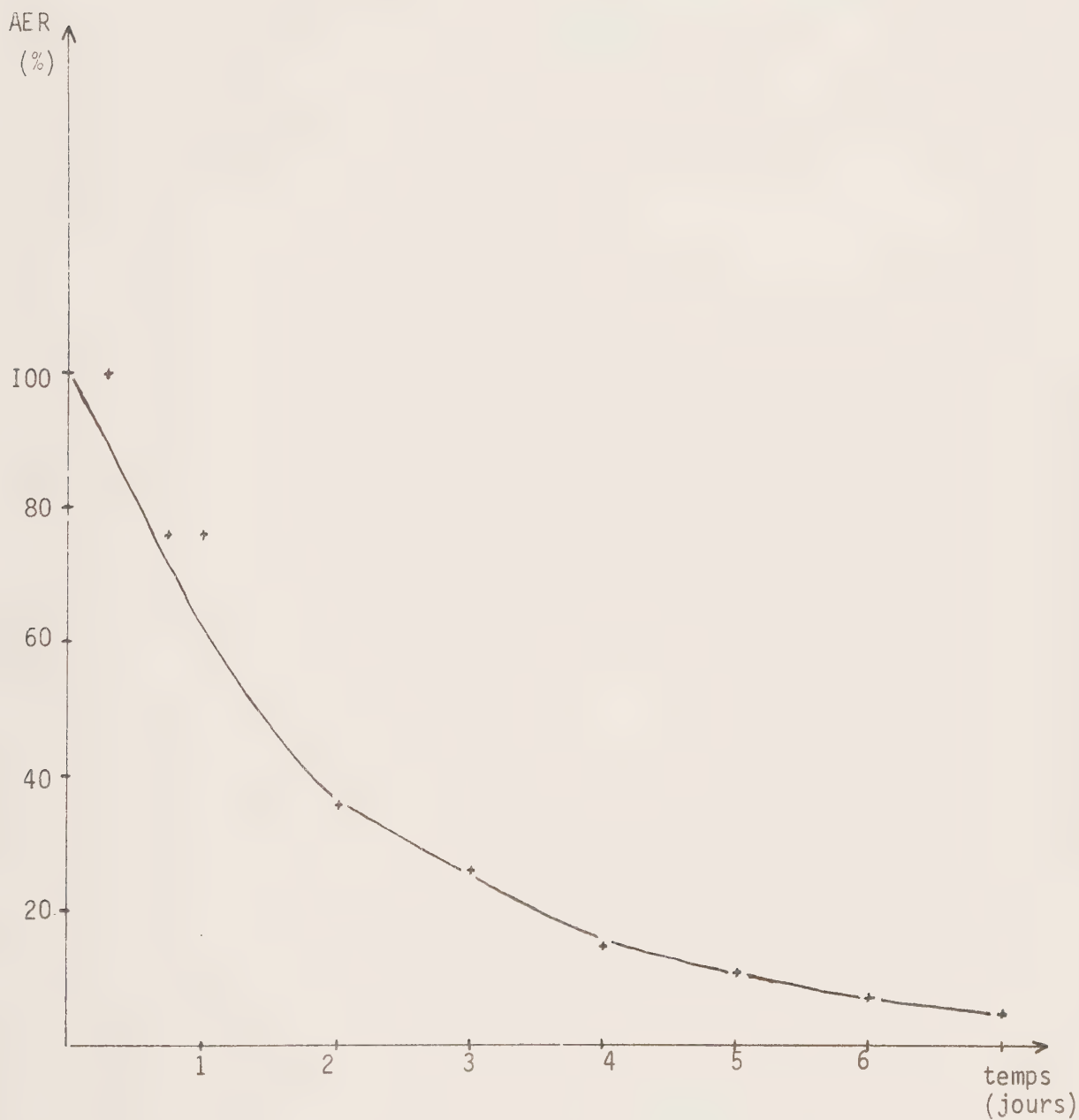
Afin de déterminer la quantité approximative d'uréase fixée sur le support par simple physisorption (12,15), nous avons fait incubé dans les conditions habituelles une solution tamponnée de 100 mg d'uréase en présence de 100 mg d'un polymère dépourvu de groupements fonctionnels réactifs, le polyméthacrylate de gaïacol. Ce polymère déjà décrit (8) a été préparé de la même façon que les VANACRYLS, afin qu'il ait une tacticité et un degré de polymérisation comparables aux précédents. Nous avons ainsi constaté que 10 % de l'uréase **initiale** restaient assez fortement adsorbés sur ce polymère non réactif, ce qui est en accord avec les résultats observés dans le cas de la trypsine et du polyméthacrylate de n-butyle (5). De plus, ni l'enzyme physisorbée, ni l'enzyme présente dans les filtrats, n'avaient été dénaturées de façon sensible au cours de l'opération. Ce dernier résultat justifie nos calculs précédents de la masse d'enzyme fixée $m_3 = m_0 - m_2$.

Nous avons ensuite cherché à réaliser des fixations plus importantes d'enzyme sur nos polymères en utilisant 50 mg d'uréase pour 100 mg de polymère. Nous avons ainsi fixé 14 mg (28 %) d'enzyme et le dérivé obtenu présentait une AER de 50 %, proche par conséquent de celle des autres dérivés.

Nous avons traité une même solution d'uréase (50 mg au départ) successivement par deux fractions de 100 mg de COVANACRYL-5 dans les conditions habituelles (24 heures à 2° et pH = 7,5), afin d'étudier comme variait le taux de fixation et l'activité résiduelle au cours de deux essais successifs. Nous avons ainsi obtenu deux dérivés insolubles numérotés respectivement I et II. Comme on pouvait s'y attendre le n° I (Fixation = 42 %, AER = 46 %) était analogue au dérivé ci-dessus ; mais par contre, le n° II (Fixation = 75 %, AER = 42 %) se caractérisait essentiellement par un taux de fixation nettement plus élevé et comparable à ceux observés dans les essais précédents pour lesquels on utilisait 10 mg d'enzyme pour 100 mg de polymère. Ce résultat semble indiquer que le taux de fixation de l'enzyme sur une même masse de polymère varie peu pour un rapport masse uréase/masse polymère compris entre $\frac{1}{10}$ et $\frac{2}{10}$ mais diminue nettement pour un rapport supérieur à $\frac{2}{10}$ que nous n'avons pas déterminé avec précision. La faible différence observée entre les AER de I et II montre que l'uréase utilisée pour les fixations était relativement pure ou tout au moins homogène (5).

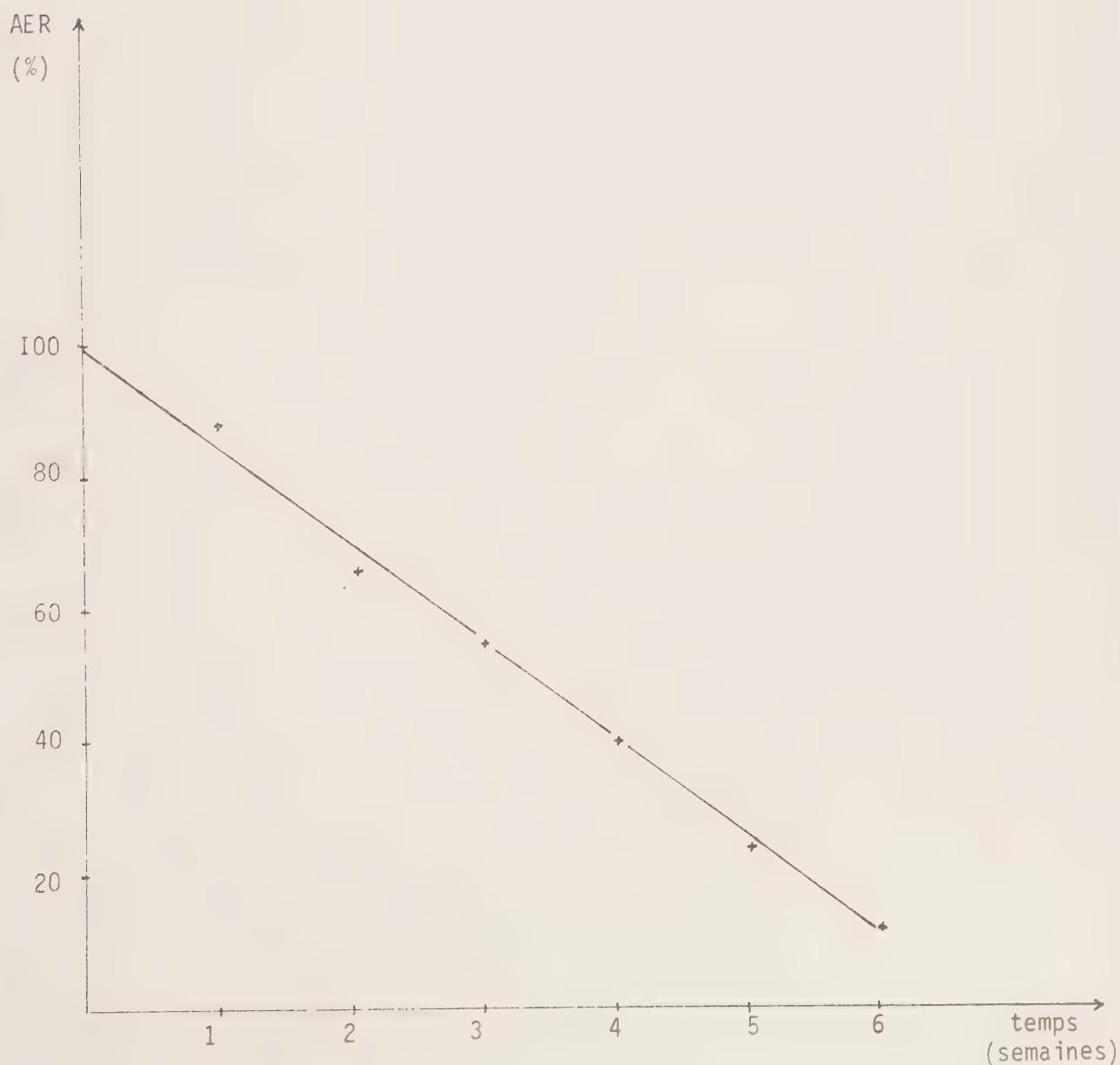
Nous avons fait passer en continu une solution d'urée à 2 g/l, tamponnée à pH = 7,5, dans une colonne thermostatée à 30° et contenant une "uréase insolubilisée" mélangée à de la célite servant de support et de ralentisseur de débit. Nous avons mesuré, tous les jours et pendant une semaine, la quantité d'urée transformée en carbonate d'ammonium, ce qui a

conduit à tracer une courbe donnant l'AER du dérivé en fonction du temps. Nous avons ainsi obtenu une courbe indiquant une perte rapide d'activité du dérivé les premiers jours, avec, après sept jours d'utilisation continue, une diminution de plus de 90 %.



Dans une colonne identique à la précédente et dans les mêmes conditions opératoires, nous avons fait passer une solution tamponnée d'urée à 0,5 g/l sur une quantité plus importante de dérivé insoluble. En dosant la solution écoulee nous avons constaté que pendant trois jours toute l'urée mise en solution avait été transformée en carbonate d'ammonium.

Nous avons mesuré chaque semaine l'activité d'un même dérivé insoluble de l'uréase obtenu à partir du VANACRYL et conservé en suspension dans l'eau à 2°, ce qui a conduit à tracer une courbe de l'AER en fonction du temps. La droite obtenue indique qu'après six semaines de conservation, le dérivé a perdu plus de 85 % de son activité originelle :



CONCLUSION

La fixation sur les VANACRYLS et COVANACRYLS de l'uréase par ses groupements basiques réactifs fournit des dérivés insolubles dans l'eau. L'activité enzymatique résiduelle (AER) des dérivés obtenus paraît dépendre assez peu du nombre de groupements hydroxyles présents dans les différents copolymères statistiques utilisés ; par contre, la fixation d'enzyme augmente comme le nombre de groupements aldéhydes présents. Les VANACRYLS semblent plus avantageux que les polyméthacrylates d'iodo-alcoyle utilisés précédemment (5), aussi bien du point de vue de la fixation que de l'AER des dérivés obtenus. Une fraction non négligeable d'enzyme semble être fixée par simple physisorption, ce qui exige des lavages importants et répétés du dérivé insoluble si on désire que l'activité de ce dernier reste constante au cours de son utilisation dans des réactions enzymatiques ultérieures.

Les dérivés obtenus, plus stables que l'uréase soluble initiale, peuvent être utilisés avec succès pour des réactions enzymatiques en continu pendant plusieurs jours de suite.

Enfin, la comparaison des présents résultats avec ceux indiqués dans la littérature (et que nous avons rappelés brièvement au début de cet exposé) montre que les dérivés insolubles de l'uréase obtenus à partir des VANACRYLS présentent des propriétés analogues à celles de la plupart des dérivés correspondants préparés par d'autres auteurs selon des méthodes différentes.

PARTIE EXPERIMENTALE

Fixation de l'uréase sur le polyméthacrylate de vanilline (VANACRYL).

Dans une fiole conique de 25 cm^3 , on agite magnétiquement à 4° ou 20° , pendant 24 ou 48 heures, une suspension de 100 mg de polymère (8) et de 10 mg d'uréase de Sigma dans 5 cm^3 d'une solution tampon phosphate 0,2 M à $\text{pH} = 7,5$.

Les dérivés insolubles sont séparés par filtration puis lavés soigneusement en plusieurs fois sur verre fritté n° 3 (Prolabo) avec une solution de chlorure de sodium M (total : 50 cm^3), puis avec de l'eau distillée (total : 45 cm^3). Les filtrats sont rassemblés (100 cm^3 au total) et le dérivé insoluble est conservé à 2° soit à l'état sec, soit en suspension dans 20 cm^3 d'eau distillée.

Mesure de l'activité de l'uréase en solutions standard (selon le même protocole opératoire que celui utilisé par la suite pour mesurer l'activité des dérivés insolubles uréase-support et de l'uréase non fixée).

A $x\text{ cm}^3$ de solution A obtenue en mélangeant 5 cm^3 de solution tampon phosphate 0,2 M ($\text{pH} = 7,5$), 50 cm^3 de chlorure de sodium M et 45 cm^3 d'eau distillée, on ajoute une quantité $y\text{ cm}^3$ d'une solution B obtenue en dissolvant 10 mg d'uréase dans 100 cm^3 de solution A, de telle façon que $x + y = 10\text{ cm}^3$ de solution C. La solution B est laissée 24 heures à 2° avant son utilisation.

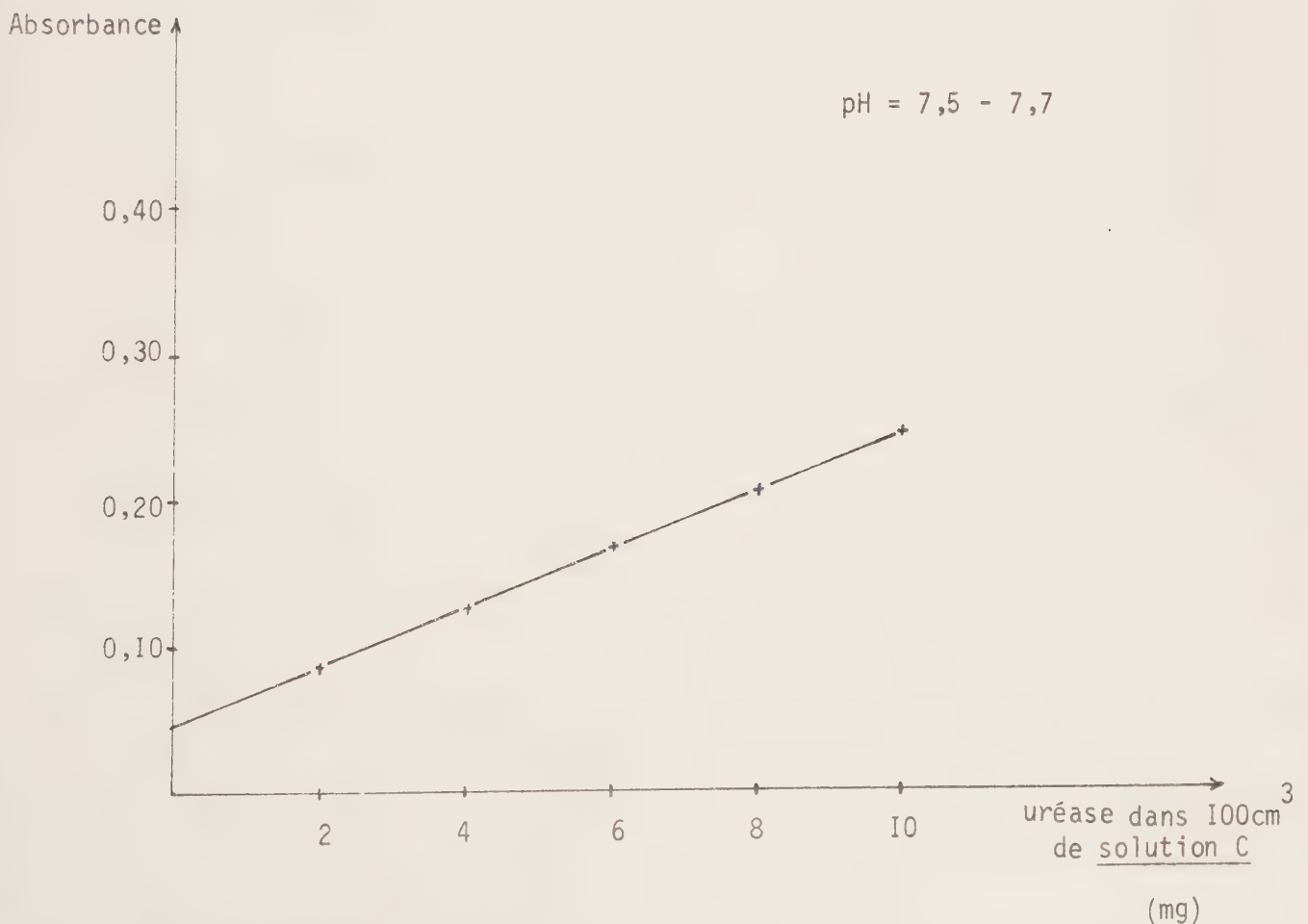
Dans un bécher de 50 cm^3 muni d'une agitation magnétique, on place les 10 cm^3 de la solution C à la température de 30° et on ajoute 20 cm^3 d'une solution d'urée à 2 g/l, à la même température. Après 5 minutes d'incubation à 30° , on verse $0,5\text{ cm}^3$ d'acide chlorhydrique 0,1 N pour détruire l'enzyme. On obtient ainsi $30,5\text{ cm}^3$ de solution D.

On place $0,2\text{ cm}^3$ de solution D dans la cuve d'un spectrophotomètre Beckmann, auquel on ajoute 3 cm^3 d'eau distillée et $0,5\text{ cm}^3$ de réactif de Nessler (14). On mesure l'absorbance de cette solution E à 490nm, ce

qui permet de tracer une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la masse d'uréase utilisée, en prenant l'eau distillée comme référence :

y (cm ³) de <u>solution B</u>	Masse d'uréase dans 10 cm ³ de <u>solution C</u> (mg)	Absorbance
2	0,2	0,085
4	0,4	0,125
6	0,6	0,165
8	0,8	0,205
10	1	0,245

La courbe obtenue est rectiligne :



Remarque : Après filtration sur verre fritté n° 3, la solution B présente la même activité : il n'y a pas de désactivation par filtration.

Mesure de l'activité des dérivés insolubles et de l'uréase non fixée.

Un dixième de la masse du dérivé séché est mis en suspension dans 10 cm³ de solution A. Après 30 minutes d'agitation magnétique à 30°, on opère comme ci-dessus. Pour doser l'activité des dérivés conservés en suspension (voir ci-dessus), on agite magnétiquement ceux-ci pendant 30 minutes à 30°, puis on verse, dans ^{un} bécher de 50 cm³, 2 cm³ (soit $\frac{1}{10}$) de cette suspension, auxquels on ajoute 8 cm³ de solution A (total 10 cm³). On obtient ainsi 10 cm³ de solution C (voir ci-dessus).

Après addition d'acide chlorhydrique, la suspension obtenue dans l'un ou l'autre cas est filtrée et le filtrat récupéré est dosé par colorimétrie selon la méthode habituelle.

Le filtrat contenant l'uréase non fixée est constitué par 100 cm³ d'une solution d'uréase dans la solution A. On prend 10 cm³ (soit $\frac{1}{10}$) de ce filtrat et l'on mesure son activité en admettant que l'activité spécifique de l'uréase non fixée n'a pas été modifiée par la présence du polymère, (ce qui est d'ailleurs démontré plus loin).

Dans les tableaux ci-après, qui rassemblent les résultats obtenus, m₁ est la masse d'uréase pure ayant même activité que le dérivé insoluble considéré, m₂ est la masse d'uréase non fixée sur le polymère et présente dans les filtrats. La masse m₃ d'uréase fixée sur le polymère est donnée par la différence m₃ = (m₀ - m₂)_{mg}, où m₀ est la masse d'enzyme mise en jeu. Les masses m₁ et m₂ sont déterminées d'après la courbe d'absorbance ci-dessus.

L'abréviation Ab. représente l'absorbance.

L'activité relative r du dérivé uréase/support par rapport à l'uréase de départ est donnée par le rapport $r = \frac{m_1}{m_0 - m_2} = \frac{m_1}{m_3}$. (r x 100 représente l'AER du dérivé).

A) Fixation sur polymère séché - Dérivé conservé à l'état sec -
(m₀ = 10 mg)

Polymère	Temps de réaction (Température)	m ₁		m ₂		m ₃ mg	r x 100 (AER)
		Ab	mg	Ab	mg		
VANACRYL	24 h (4°)	0,145	1	0,17	6,2	3,0	27
COVANACRYL-5	24 h (4°)	0,07	0,25	0,17	6,2	1,6	7

B) Fixation sur polymère préalablement humidifié pendant 24 heures - - 120 -
Dérivé conservé à l'état sec - ($m_0 = 10$ mg)

Polymère	Temps de réaction (et température)	m_1		m_2		m_3 mg	r x 100
		Ab.	mg	Ab.	mg		
VANACRYL	24 H (4°)	0,075	0,3	0,155	5,5	4,5	7
COVANACRYL-5	24 H (4°)	0,085	0,4	0,165	6	4	10

C) Fixation sur polymère préalablement humidifié pendant 24 heures - Dérivé conservé en suspension dans l'eau - ($m_0 = 10$ mg)

Polymère	Temps de réaction (et température)	m_1		m_2		m_3 mg	r x 100
		Ab.	mg	Ab.	mg		
VANACRYL	24 H (4°)	0,145	2,5	0,13	4,3	5,7	44
VANACRYL	48 H (4°)	0,145	2,5	0,13	4,3	5,7	44
VANACRYL	48 H (20°)	0,10	1,4	0,155	5,5	4,5	31

Ces dérivés ont conservé la même activité après 8 jours de stockage en suspension à 2°.

D) Fixation sur divers copolymères dans les mêmes conditions que ci-dessus (C)

Polymère	Temps de réaction (et température)	m_1		m_2		m_3 mg	r x 100
		Ab.	mg	Ab.	mg		
VANACRYL	24 H (4°)	0,145	2,5	0,13	4,3	5,7	44
COVANACRYL-5	24 H (4°)	0,195	3,8	0,10	2,8	7,2	53
COVANACRYL-3	24 H (4°)	0,18	3,4	0,12	3,8	6,2	55
COVANACRYL-2	24 H (4°)	0,19	3,2	0,13	4,2	5,8	55
COVANACRYL-1	24 H (4°)	0,165	3	0,135	4,5	5,5	54,5

E) Fixation d'une masse plus grande d'uréase ($m_0 = 50$ mg)

La fixation se fait dans les conditions habituelles sur 100 mg de polymère, mais on lave avec quatre fois plus de solution de chlorure de sodium et d'eau distillée. On obtient ainsi 400 cm³ de filtrat au lieu de 100 cm³ précédemment. Pour la mesure d'activité enzymatique, on prend $\frac{I}{80}$ de cette solution, soit 8 fois moins que dans les solutions-standard. La masse d'enzyme non fixée est alors égale à 8 m₂, m₂ étant la valeur donnée par les courbes précédentes. Pour mesurer l'activité enzymatique du dérivé obtenu, on en prend $\frac{I}{20}$ (et non pas $\frac{I}{10}$) : la masse d'enzyme pure ayant la même activité que le dérivé est ainsi égale à 2 m₁, (m₁ étant la valeur donnée par les courbes précédentes). L'activité relative r du dérivé est égale à $\frac{2m_1}{50-8m_2}$ et l'AER vaut $\frac{2 m_1}{50-8m_2} \times 100$.

Résultats obtenus :

Polymère : COVANACRYL-3
 Temps et température de fixation : 24 h à 4°
 m₁ = 3,5 mg (Absorbance = 0,115)
 m₂ = 4,5 mg (Absorbance = 0,135)
 Masse fixée = 14 mg (taux de fixation = 28 %)
 AER = 50 %

F) Fixations successives d'un même lot d'uréase sur plusieurs lots de polymère.

Dans une fiole conique de 25 cm³, on agite magnétiquement pendant 24 h à 4° une suspension de 100 mg de COVANACRYL-5 dans 5 cm³ de tampon phosphate 0,2 M (pH = 7,5). On ajoute alors 50 mg d'uréase et on maintient l'agitation pendant 24 heures à 4°. Ensuite, on filtre sur verre fritté n° 3 (Prolabo) et on récupère le filtrat (solution I). On met de côté 0,1 cm³ (soit $\frac{1}{50}$) de cette solution I, on traite le reste par 100 mg de COVANACRYL-5 et on procède comme ci-dessus à une nouvelle fixation. Le premier dérivé (I) est lavé par 100 cm³ de solution A (lavage I). Le second dérivé (II) est récupéré par filtration et lavé en plusieurs fois avec 50 cm³ de solution M de chlorure de sodium puis 45,1 cm³ d'eau distillée. On rassemble les filtrats (total : 100 cm³) (solution II). Les deux dérivés sont conservés à 2° en suspension dans 20 cm³ d'eau distillée. Pour les mesures d'activité enzymatique on prend :

- $0,1 \text{ cm}^3$ (soit $\frac{1}{50}$) de solution I + $9,9 \text{ cm}^3$ de solution A
- 10 cm^3 (soit $\frac{1}{50}$) de lavage I.
- 1 cm^3 (soit $\frac{1}{20}$) de la suspension du dérivé I + 9 cm^3 de solution A.
- 10 cm^3 (soit $\frac{1}{10}$) de solution II.

La masse d'enzyme non fixée lors de la première fixation est donc égale à cinq fois la valeur m_2 trouvée lors de la mesure dans les conditions habituelles. De même la masse M d'uréase ayant même activité que les dérivés est égale à deux fois la valeur m_1 trouvée.

Résultats :

N° des fixations		m_1		m_2		masse non fixée (mg)	Masse fixée (mg)	Taux de fixation (%)	M mg	AER
		Ab.	mg	Ab.	mg					
I	Solution I			0,14	4,8	29,2	20,8	42		46
	Lavage I			0,15	5,2					
	Dérivé I	0,14	4,8						9,6	
II	Solution II			0,165	6	6	18	75		42
	Dérivé II	0,12	3,75						7,5	

G) Adsorption d'uréase sur le polyméthacrylate de gaïacol -

Le polyméthacrylate de gaïacol est mis en présence d'uréase dans les mêmes conditions opératoires que pour les VANACRYLS utilisés ci-dessus. La masse de polymère mise en oeuvre est de 100 mg et la masse d'uréase de 10 mg. Pour mesurer l'activité enzymatique du dérivé on prend $\frac{1}{4}$ de la suspension au lieu de $\frac{1}{10}$ habituellement : la valeur m_1 trouvée doit être divisée par 2,5 pour représenter la masse M d'uréase ayant même activité que le dérivé. m_3 est la masse d'uréase fixée par physisorption :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Polymère : Polyméthacrylate de gaïacol.} \\ \text{Temps et température de fixation : 24 h à } 4^{\circ} \\ m_1 = 2,7 \text{ mg (Absorbance = 0,10)} \\ m_2 = 9 \text{ mg (Absorbance = 0,225)} \\ \text{Masse fixée : } m_3 = 1 \text{ mg (Taux de fixation par physisorption = 10 \%)} \\ M = \frac{m_1}{2,5} = 1 \text{ mg.} \end{array} \right.$$

H) Activités comparées d'un dérivé insoluble uréase/covanacryl-2 et de l'uréase soluble en fonction du pH -

On met 2 cm^3 (soit $\frac{1}{10}$) d'une suspension de dérivé insoluble uréase-covanacryl-2 (préparé selon le paragraphe D), en contact avec 8 cm^3 d'une solution tampon phosphate 0,2 M permettant de fixer le pH du mélange. On agite 10 minutes à 30° puis on ajoute 20 cm^3 d'urée à 2 g/l aux mêmes température et pH. On laisse incuber 5 minutes à 30° puis on ajoute $0,5 \text{ cm}^3$ d'acide chlorhydrique 0,1 N et on filtre sur verre fritté. L'activité est mesurée comme précédemment pour les solutions-standard. On observe une activité maximale à pH = 7 comme pour l'uréase (5 mg dans 100 cm^3 de solution A) étudiée dans les mêmes conditions opératoires.

L'activité relative r du dérivé insoluble aux différents pH a été calculée comme étant le rapport entre la masse m d'uréase pure ayant la même activité à pH = 7,5 que le dérivé au pH considéré, et la masse correspondante trouvée pour ce même dérivé à pH 7. On fait de même pour l'uréase soluble.

(Pour les courbes $r = f(\text{pH})$ voir partie théorique)

pH		Absorbance	m (mg)	r (%)
6	uréase	0,145	5	49
	dérivé	0,21	8,2	80
6,5	uréase	0,20	7,7	75
	dérivé	0,235	9,5	93
7	uréase	0,25	10,2	100
	dérivé	0,25	10,2	100
7,5	uréase	0,22	8,7	85
	dérivé	0,23	9,2	90
8	uréase	0,19	7,3	71
	dérivé	0,20	7,7	75

Colonnes d'uréase insoluble -

Dans une colonne en verre, thermostatée à 30°, on dispose entre deux couches minces de sable de Fontainebleau une couche de 60 mg de dérivé insoluble uréase/vanacryl mélangé à 3,5 g de célite, et on fait percoler une solution d'urée à 2 g/l (tampon phosphate 0,02 M à pH 7,5).

Pour mesurer l'activité de la colonne (dont le débit n'est pas constant) on récupère la solution qui s'écoule en 10 mn. Puis on prend 1 cm³ de cette solution, auquel on ajoute 9 cm³ de solution A (ce qui donne 10 cm³ de solution B). On dose ensuite selon la méthode habituelle et on obtient ainsi la masse M d'enzyme produisant la même absorption que 1 cm³ de solution. Pour trouver la masse d'enzyme ayant la même activité que la colonne, on multiplie la valeur ci-dessus par le volume écoulé en 10 minutes (débit).

Temps (h)	Débit (cm ³ /10 mn)	Absorbance	Masse d'uréase M (mg)	Débit x Masse M	r (%)
6	2,6	0,25	10,2	26,5	100
18	2,6	0,20	7,8	20,3	76
24	2,6	0,20	7,6	20,3	76
48	1,8	0,15	5,3	9,5	36
72	1,8	0,12	3,8	6,8	26
96	1,6	0,095	2,5	4	15
120	1,6	0,08	1,8	2,9	11
144	1,5	0,07	1,3	1,95	7
168	1,5	0,06	0,8	1,2	5

(Pour la courbe $r = f(t)$, voir partie théorique)

On a dosé à nouveau les premiers éluats obtenus après les avoir conservés 24 h à 4° et on a trouvé les mêmes valeurs qu'au départ : il n'y a donc pas eu de passage de l'uréase fixée dans l'éluat.

Dans une seconde colonne identique à la première, on dispose une couche de 100 mg de dérivé insoluble obtenu à partir de COVANACRYL-5 mélangé à 3,5 g de célite au travers de laquelle on fait percoler pendant 3 jours de suite une solution d'urée à 0,5 g/l (tampon phosphate 0,02 M à pH 7,5) et maintenue à 30°. Par dosage de l'éluat on constate que l'urée en solution est intégralement transformée en carbonate d'ammonium.

Activité en fonction du temps de stockage.

On a mesuré selon la méthode habituelle l'activité enzymatique d'un dérivé insoluble d'uréase, obtenu à partir de VANACRYL, et conservé en suspension dans l'eau distillée à 4°. On trouve ainsi la masse M d'uréase soluble ayant la même activité que le dérivé. Dans le tableau ci-dessous, r représente le pourcentage d'activité du dérivé par rapport à l'activité maximale originelle:

Temps de stockage (semaines)	Absorbance	Masse d'uréase M (mg)	r (%)
0	0,13	4,2	100
1	0,12	3,7	88
2	0,10	2,8	66
3	0,09	2,3	55
4	0,08	1,7	40
5	0,065	1	24
6	0,055	0,5	12

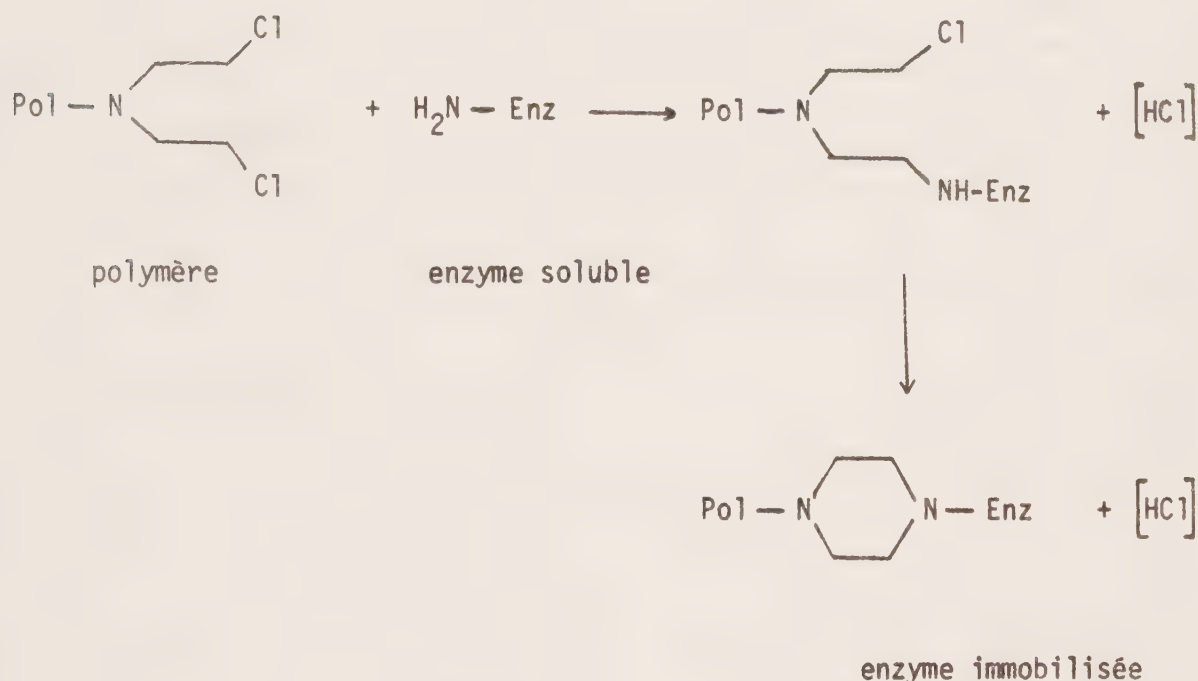
(Pour la courbe $r = f(t)$, voir partie théorique)

B I B L I O G R A P H I E

- 1) E. RIESEL et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1964, 239, 1521.
- 2) E. KATCHALSKI et A. BAR-ELI, Brevet Britannique n° 916 931, 1963. (Chem. Abstr., 1963, 58, II 618 h).
- 3) E. KATCHALSKI et A. BAR-ELI, Brevet Israélien n° 13 950, 1960. (Chem. Abstr. 1962, 56, 7 702 h).
- 4) E. BROWN, A. RACOIS et H. GUENIFFEY, Tetrahedron Letters, 1970, 25, 2139.
- 5) E. BROWN et A. RACOIS, Bull. Soc. Chim., 1971, 12, 4351.
- 6) M. KITAJIMA et S. MIYANO, Kogyo Kagaku Zasshi, 1969, 72 (2), 493. (Chem. Abstr., 1969, 70, II 8 067 a).
- 7) Chem. Eng. News, 15 février 1971, p. 86.
- 8) E. BROWN et A. RACOIS, Travaux à paraître.
- 9) I.H. SILMAN et E. KATCHALSKI, Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, part. II, 873.
- 10) H.R. MANLER et E.H. CORDES, Biological Chemistry, Harper & Row, London, 1967, 278.
- 11) E.S. WEST, W.R. TODD, H.S. MASON et J.J. VAN BRUGGEN, A text book of Biochemistry, Mc Millan, London, 1970, 326.
- 12) A.S. LINDSEY, Revs. Macromol. Chem., 1969, C 3 (I), I.
- 13) Référence 10, p. 12.
- 14) Y. TIFFON, J.P. PUJOL et P. LUBET, Trav. Prat. de Biologie des Animaux, Faculté des Sciences, Caen.
- 15) H. BRANDENBERGER, Rev. Ferment. Ind. Aliment., 1956, II, 237.

IMMOBILISATION DE LA
TRYPSINE SUR DES POLYMERES
POSSEDANT DES GROUPEMENTS
BIS (β -CHLOROETHYL)AMINO

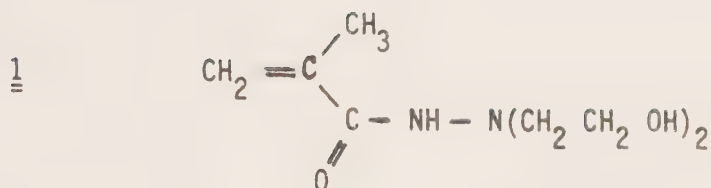
Poursuivant nos recherches sur l'immobilisation des enzymes, nous nous sommes proposé d'utiliser le groupement fonctionnel bis(β -chloro-éthyl) amino pour lier la trypsine sur une chaîne méthacrylique. A notre connaissance, c'est la première fois que ce type de groupement fonctionnel réactif est utilisé pour immobiliser une enzyme. La réaction probable de fixation de l'enzyme Enz-NH_2 sur un polymère $\text{Pol-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$ peut s'écrire ainsi :



En effet, la présence d'un groupement aminé en β du chlore confère à celui-ci une réactivité toute particulière (propriété bien connue des moutardes à l'azote). Le chlore n'est réactif que si le doublet de l'azote reste libre et susceptible de former les ions intermédiaires suivants:



Dans un premier temps, nous avons réalisé la synthèse de l'allyldiéthanolamine, de la diallyléthanolamine puis de la méthallyldiéthanolamine, mais les divers essais de polymérisation de ces monomères ont invariablement échoué. Nous avons alors entrepris la synthèse de la méthacrylylhydrazide 1 à partir de la N,N-bis- β -hydroxyéthylhydrazine en vue d'une polymérisation puis d'une chloration partielle du polymère obtenu.

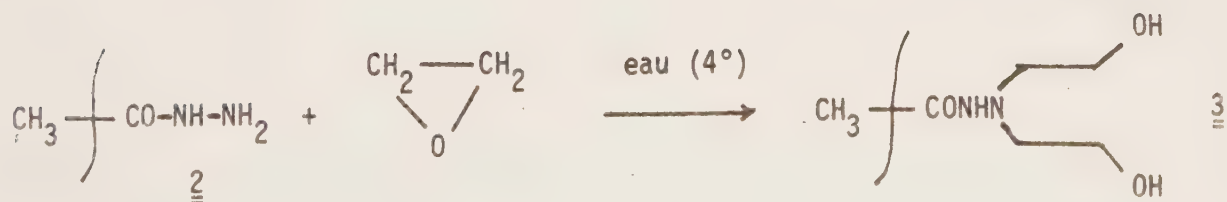
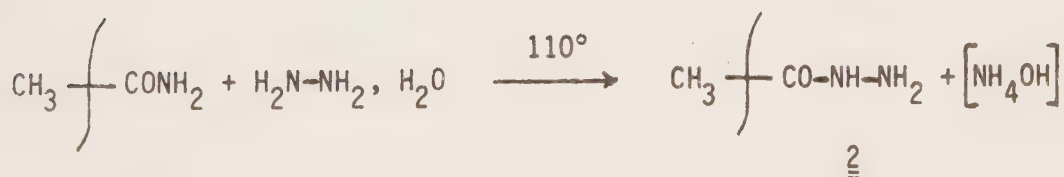


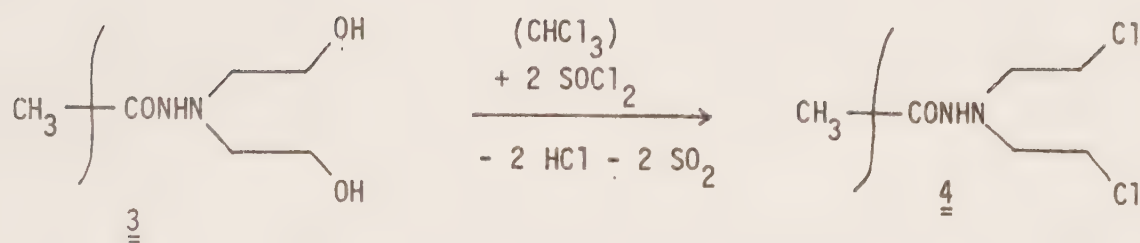
Mais le monomère 1 est très visqueux et ne peut être purifié, ce qui exclut toute polymérisation digne d'intérêt. La chloration du composé 1 brut ne donne que des goudrons. Nous avons alors décidé de partir de polymères simples et décrits et d'y introduire le groupement bis-(β chloro-éthyl) amino grâce à une suite de réactions appropriées.

Nous décrivons ci-après les travaux que nous avons effectués dans ce sens.

I - SYNTHESE DES POLYMERES

Les différentes réactions suivantes ont été utilisées et étudiées :





Poly (méthacrylylhydrazide) (2)

Nous avons réalisé la polymérisation radicalaire du méthacrylate de méthyle commercial en solution dans le benzène (1). Ce polymère réagit à 110° avec l'hydrate d'hydrazine pour donner le polymère 2 déjà décrit (2). Celui-ci est insoluble dans l'éthanol mais soluble dans l'eau. La réaction est pratiquement totale (d'après l'analyse et la R.M.N.).

La méthacrylamide du commerce est polymérisée par voie radicalaire dans le toluène (3). La polyméthacrylamide obtenue réagit également à 110° avec l'hydrate d'hydrazine (4) pour donner le polymère 2. La réaction est là encore presque totale d'après l'analyse.

Contrairement à la polyacrylylhydrazide décrite (5), le polymère 2 est très stable à l'état sec et ne présente apparemment pas de réticulation, même après plusieurs mois de stockage à température ambiante. Sa solubilité dans l'eau reste totale.

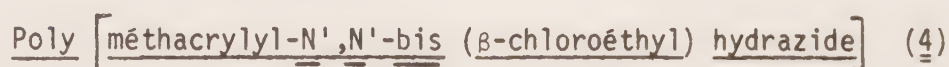
Poly [méthacrylyl-N',N'-bis (β-hydroxyéthyl) hydrazide] (3)

La polyméthacrylylhydrazide (2) réagit avec l'oxyde d'éthylène en solution dans l'eau froide (6) pour donner le polymère 3 avec un bon rendement.

L'analyse et les spectres montrent que la réaction d'addition est pratiquement totale. Le polymère 3 est soluble dans l'eau et l'éthanol et se présente sous forme de poudre blanche.

Le polymère 3 peut être également obtenu par réaction du polyméthacrylate de méthyle avec la N,N-bis-(β -hydroxyéthyl) hydrazine préparée à partir d'hydrate d'hydrazine et d'oxyde d'éthylène en solution dans l'éthanol à -15° (7). Le taux de transformation est très important et le spectre de R.M.N. du produit obtenu ne présente pas de pic correspondant au méthoxyle de l'ester de départ. La poudre blanche obtenue est également soluble dans l'eau et l'éthanol.

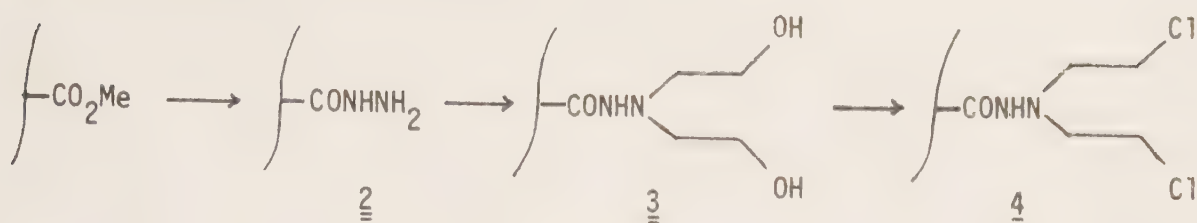
Le chlorure de méthacrylyle peut être polymérisé radicalairement en solution dans le dioxanne (8). Nous avons observé que le polymère obtenu réagit, en solution dans la diméthylformamide, avec la N,N-bis-(β -hydroxyéthyl) hydrazine pour donner le polymère 3 avec un bon rendement et un taux d'amidification très important. La poudre blanche obtenue est soluble dans l'eau et l'éthanol.



Le polymère 3, en solution dans le chloroforme, a été amené à réagir avec le chlorure de thionyle à l'abri de la lumière (9). Le polymère 4 obtenu au bout de 48 heures se présente sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau. Le taux de chloration est supérieur à 60 % d'après la R.M.N. et l'analyse.

Le polyméthacrylate de méthyle que nous avons obtenu a une masse moyenne de 43 000 et un degré de polymérisation voisin de 430. En R.M.N., un examen détaillé des pics constituant la "triade" due aux méthyles de la chaîne (10) montre que le polymère a une prédominance syndiotactique, un fort pourcentage d'enchaînements hétérotactiques et très peu d'enchaînements isotactiques. Les spectres de R.M.N. de la polyméthacrylamide obtenue selon YOKOTA (3) montrent également que le polymère a une prédominance syndiotactique. Etant donné que ces deux dérivés polyméthacryliques constituent des points de départ pour la préparation du polymère 2, ce dernier présente vraisemblablement le même enchaînement à prédominance syndiotactique. On sait en effet (11) que les réactions d'hydrolyse ou de réduction d'un polyester méthacrylique ne changent pas la disposition spatiale de la chaîne macromoléculaire. Il en est de même pour les polymères 3 et 4 obtenus soit à partir de 2, soit à partir du polychlorure de méthacrylyle.

Il est à noter que la suite de réactions la plus facile à mettre en oeuvre est la suivante :

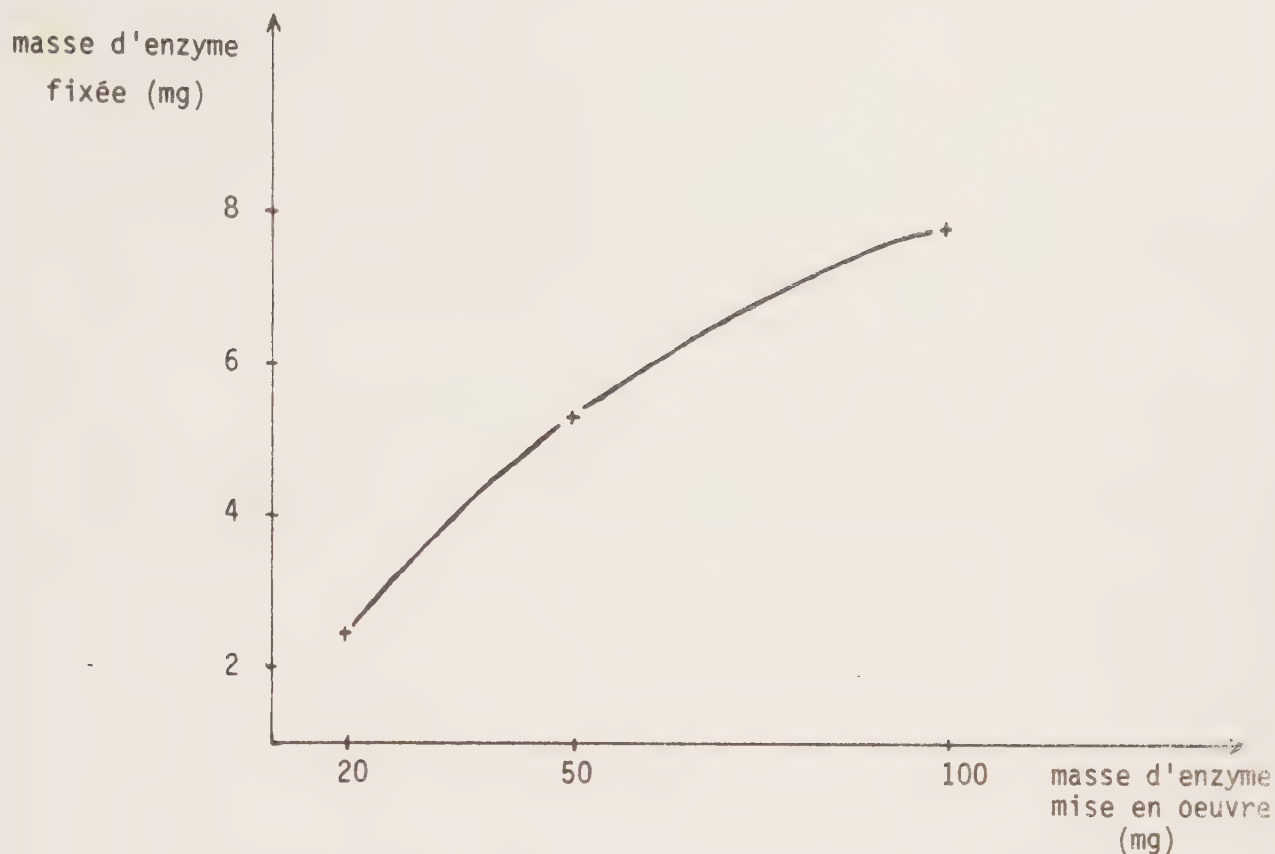


II - IMMOBILISATION DE LA TRYPSINE

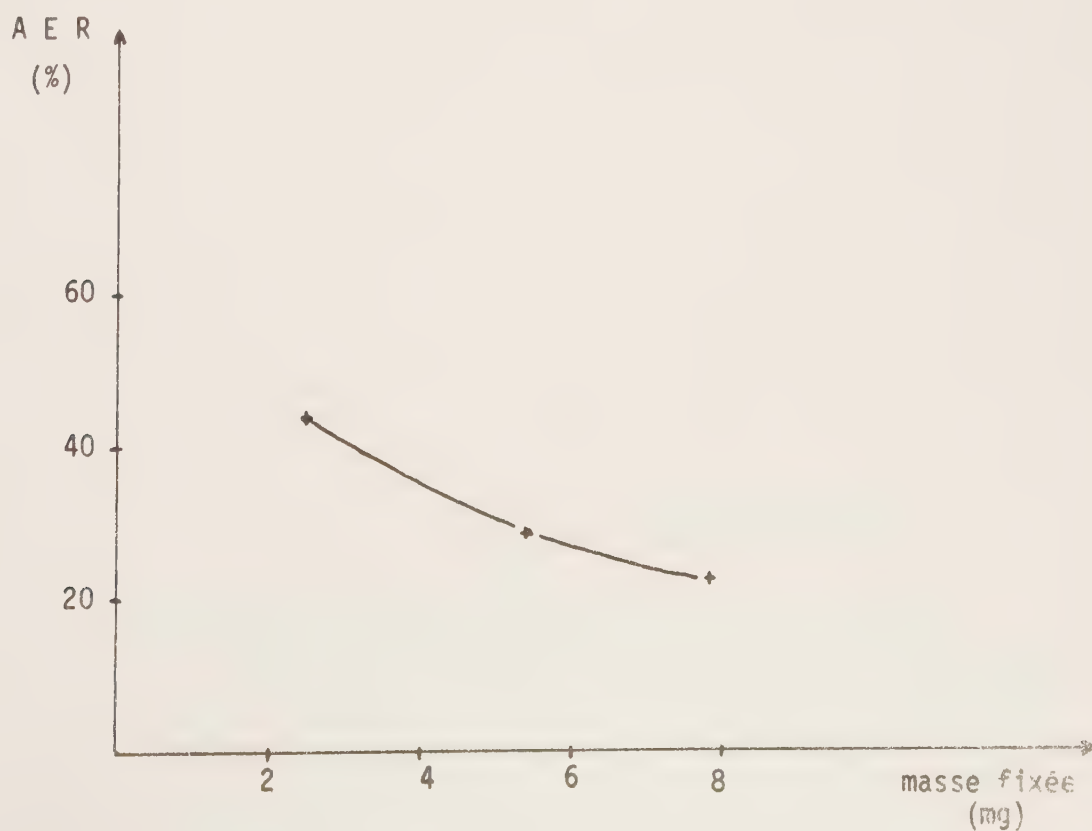
Le greffage de trypsine lyophilisée sur le polymère 4 a été réalisé en solution tampon phosphate décimolaire à pH 7,2 ou 7,5 pendant 24 heures à 4°, en prenant 20, 50 ou 100 mg d'enzyme pour 100 mg de polymère. Le dérivé insoluble obtenu a été centrifugé puis lavé avec une solution de NaCl, M et de l'eau en plusieurs fois, jusqu'à ce que la dernière eau de lavage ne présente plus d'activité enzymatique appréciable. L'enzyme immobilisée est conservée à l'état lyophilisé.

L'activité trypsique des dérivés insolubles a été mesurée à pH = 8 par titrage automatique (pH-stat) à la soude de l'acide libéré par hydrolyse enzymatique d'un substrat de la trypsine, le chlorhydrate de N-benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) (12). Des solutions-étalons donnant la masse de substrat hydrolysé en 3 minutes, en fonction de la masse de trypsine, ont permis de calculer la masse d'enzyme fixée sur le polymère et l'activité relative du dérivé insoluble par rapport à la trypsine originelle. Nous avons calculé la quantité d'enzyme fixée par la différence entre la masse totale mise en oeuvre et la masse non fixée présente dans les filtrats. Cette masse d'enzyme non fixée a été évaluée par mesure de l'activité trypsique du filtrat dans les mêmes conditions que pour les solutions - étalons.

Nous avons constaté que pour une même masse d'enzyme mise en oeuvre, la quantité de trypsine fixée est plus importante à pH 7,5 qu'à pH 7,2. De plus, pour une même quantité de polymère, la masse d'enzyme fixée augmente en même temps que la masse utilisée pour la fixation :

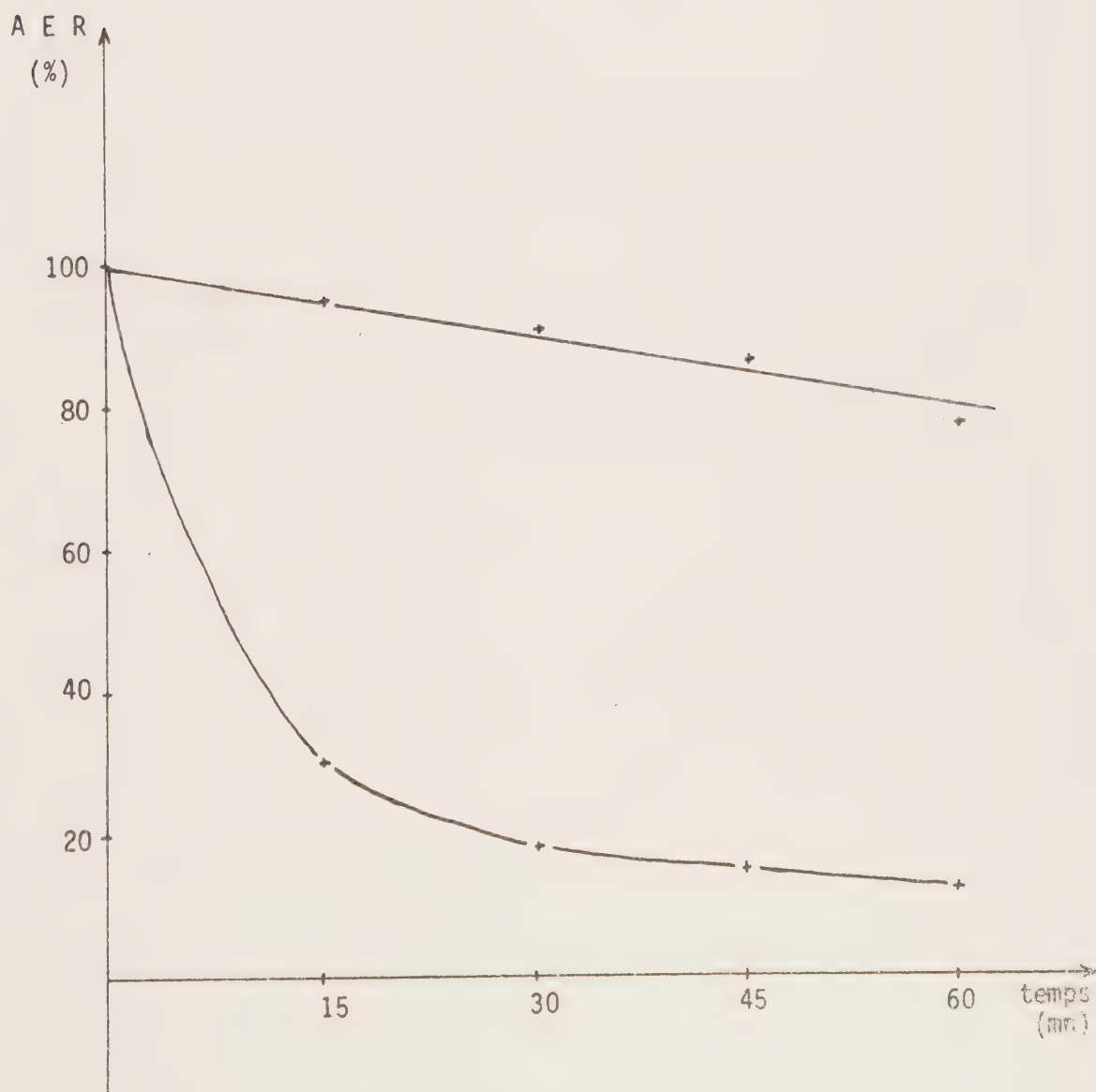


Par contre, quand la masse d'enzyme fixée augmente, l'activité enzymatique résiduelle (A E R) du dérivé insoluble diminue. Un tel phénomène a été observé à diverses reprises pour d'autres types d'enzymes immobilisées (13) :



Après conservation pendant 48 heures à 4° dans une solution molaire de chlorure de sodium, suivie de filtration et remise en suspension, les dérivés présentent la même activité qu'au départ et les filtrats ne présentent aucune activité trypsique. La trypsine reste donc fixée en totalité sur le support, ce qui semble indiquer que la fixation se fait par liaisons covalentes et non par simple physisorption.

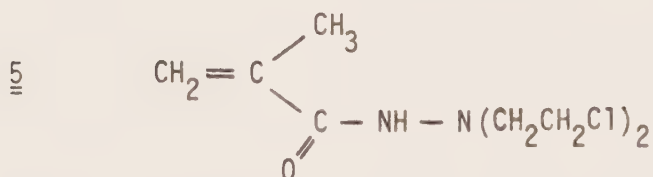
Une incubation à 55° (14) de la trypsine originelle et de son dérivé insoluble montre que ce dernier résiste beaucoup mieux à la dénaturation thermique, fait que nous avons déjà constaté dans le cas du Vanacryl (15) :



III - CONCLUSION -

Il est possible d'immobiliser des enzymes sur des polymères acryliques possédant des groupements fonctionnels bis-(β-chloroéthyl) amino. La masse d'enzyme fixée par liaison covalente est relativement élevée. Ainsi, elle est plus grande que dans le cas des vanacryls (15) et des poliodals (16) précédemment étudiés. L'A E R des dérivés ainsi obtenus est comparable à celle des trypsines immobilisées déjà décrites.

Finalement, le principal inconvénient de ces nouveaux supports réside dans la complexité relative de leur préparation. Il pourrait être intéressant de synthétiser le monomère 5 et d'en effectuer la polymérisation,



car ceci permettrait d'obtenir des supports mieux définis et plus reproductibles. Néanmoins, il convient de noter que le composé 5 appartient à la famille des ypérites à l'azote et que sa toxicité probablement élevée poserait des problèmes délicats de manipulation et de mise en oeuvre.

P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

I - SYNTHESE DES POLYMERES

Polyméthacrylate de méthyle

Dans un ballon de 100 cm³, on chauffe pendant 24 heures à reflux une solution de méthacrylate de méthyle distillé (12 g) et d'A I B N (0,06 g) dans le benzène (60 cm³), puis on traite par 200 cm³ de méthanol. Le polymère précipité est dissous dans 60 cm³ de benzène puis reprécipité au méthanol. Après séchage sous vide, on obtient 9,5 g (80 %) d'un polymère conforme à la littérature (1).

$$\overline{Mn} = 43\ 000$$

Poly(méthacrylylhydrazide) (2)

Dans un ballon de 250 cm³, on introduit 10 g de polyméthacrylate de méthyle et 100 g d'hydrate d'hydrazine (5). Après 24 heures d'agitation à 110°, on évapore la moitié du solvant et on précipite le polymère dans un mélange de 500 cm³ de méthanol et de 1 cm³ d'acide acétique. Le polymère est séché, repris dans 50 cm³ d'eau et précipité à nouveau dans 500 cm³ de méthanol. Après séchage sous vide en présence de H₂SO₄ concentré, on obtient 7 g (70 %) de poly(méthacrylylhydrazide) (2) (solide blanc) (2).

<u>Analyse</u>	(C ₄ H ₈ N ₂ O)	Calc. %	C 47,98	H 8,05	N 27,98	O 15,98
	Tr.		48,62	8,01	27,14	16,12

Spectre I R (cm⁻¹) (KBr) : ν_{NH} 3300 ; ν_{CO} 1700

Spectre R M N (D M S O, d₆) (ppm) :

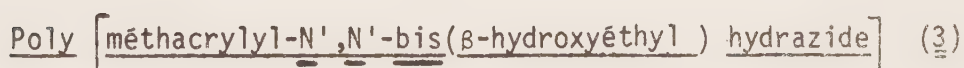
- δ 4,6 (massif) (aire 3)
(>NH)
- δ 1,9 (massif) (aire 2)
(-CH₂- de la chaîne
macromoléculaire)
- δ 1,1 (massif) (aire 3)
(-CH₃)

Polyméthacrylamide

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 6 g de méthacrylamide (recristallisée dans CH₂ Cl₂), 40 cm³ de toluène et 0,06 g de peroxyde de benzoyle (3). On laisse 24 heures au reflux du toluène, puis le mélange est versé dans 200 cm³ d'éther de pétrole qui précipite le polymère. Après séchage sous vide, on obtient 5,6 g (90 %) d'un polymère conforme à la littérature (3).

La polyméthacrylamide réagit avec l'hydrate d'hydrazine dans les mêmes conditions que le polyméthacrylate de méthyle. L'analyse de la poly(méthacrylylhydrazide) ainsi obtenue montre que la substitution est presque quantitative. Le spectre de R M N est identique à celui détaillé plus haut.

<u>Analyse</u> (C ₄ H ₈ N ₂ O)	Calc. %	C 47,98	H 8,05	N 27,98	O 15,98
	Tr.	46,40	8,31	26,32	18,78



1ère méthode

Dans une fiole conique de 100 cm³, on introduit 1 g de polymère 2 et 20 cm³ d'eau froide. Sous forte agitation, on ajoute lentement 10 cm³ d'oxyde d'éthylène et on laisse 48 heures à 4° (6). On précipite le polymère dans 200 cm³ d'acétone et après séchage sous vide, on obtient 1,4 g (76 %) de polymère 3 (solide blanc).

<u>Analyse</u> (C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃)	Calc. %	C 51,05	H 8,57	N 14,88	O 25,50
	Tr.	51,66	8,88	13,00	26,23

<u>Spectre R M N</u> (D ₂ O) (ppm)	∴	δ 4,65 (massif) (aire 3) (>NH et -OH)
		δ 3,8 (massif) (aire 4) (-CH ₂ OH)
		δ 2,2 (massif) (aire 4) (-CH ₂ N<)
		δ 1,9 (massif) (aire 2) (-CH ₂ - de la chaîne macromoléculaire)
		δ 1,1 (massif) (aire 3) (-CH ₃)

2ème méthode

Dans un bicol de 500 cm³, on introduit sous forte agitation 88 g (2 moles) d'oxyde d'éthylène et 70 cm³ d'éthanol purifié. Après avoir refroidi le mélange à -15°, on ajoute lentement une solution de 50 g (1 mole) d'hydrate d'hydrazine dans 70 cm³ d'éthanol (la température ne doit pas monter au-dessus de -10°). On laisse une nuit sous agitation à la même température puis on évapore le solvant. Après distillation sous pression réduite, on obtient 76 g (63 %) de N,N-bis-(β-hydroxyéthyl) hydrazine (liquide incolore) dont le point d'ébullition (Eb₁₂ = 162-164°) est en accord avec la littérature (6 et 7).

La N,N-bis-(β-hydroxyéthyl) hydrazine peut être également obtenue en remplaçant l'éthanol par l'eau à 10° (6) mais le rendement est moins bon.

Dans un bicol de 100 cm³, on introduit, sous courant d'azote, 5 g de polyméthacrylate de méthyle et 40 g de N,N-bis-(β-hydroxyéthyl) hydrazine. Après 24 heures à 120° sous agitation magnétique, le mélange est précipité dans 200 cm³ d'acétone. Le polymère obtenu est dissous dans 20 cm³ de méthanol et précipité à nouveau dans 200 cm³ d'acétone. Après séchage sous vide, on obtient 7 g (76 %) de polymère 3 (solide blanc). Le spectre de R M N est identique à celui détaillé plus haut.

<u>Analyse</u> (C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃)	Calc. %	C 51,05	H 8,57	N 14,88	O 25,50
	Tr.	52,12	8,44	12,46	26,93

3ème méthode

Dans un ballon de 500 cm³ on introduit 86 g d'acide méthacrylique distillé et 300 cm³ de chlorure de benzoyle purifié (17). Le mélange est porté au reflux et le chlorure de méthacrylyle formé est distillé (Eb = 100-102°) (80 g, 80 %). Le point d'ébullition et le rendement sont en accord avec la littérature (17).

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 12 g de chlorure de méthacrylyle, 40 cm³ de dioxanne purifié et 0,12 g (1 %) d'A I B N (8). On laisse 24 heures à 80°, puis on verse le mélange refroidi dans 200 cm³ de méthanol qui précipite le polymère. Celui-ci est dissous dans 40 cm³ de dioxanne puis reprécipité de la même façon. Après séchage dans un dessiccateur sous pression réduite, on obtient 8,2 g (68 %) de poly(chlorure de méthacrylyle) (solide blanc) dont les spectres sont en accord avec la littérature (8).

Dans un bicol de 100 cm³, on introduit 4 g de poly (chlorure de méthacrylyle), 10 g de N,N-bis-(β-hydroxyéthyl) hydrazine et 40 cm³ de diméthylformamide purifiée. Après 3 heures à 80° sous agitation magnétique et courant d'azote, on verse le mélange dans 200 cm³ d'acétone qui précipite le polymère. Celui-ci est dissous dans 40 cm³ de méthanol et reprécipité de la même façon. Après séchage dans un dessiccateur sous pression réduite, on obtient 6,3 g (87 %) de polymère 3. Les spectres I R et de R M N indiquent que la réaction précédente est pratiquement totale.

Poly [méthacrylyl-N',N'-bis-(β-chloroéthyl) hydrazide] (4)

Dans une fiole conique de 50 cm³, on introduit 2 g de polymère 3 et 10 cm³ de CHCl₃ anhydre et on ajoute lentement une solution de 4 cm³ de SOCl₂ purifié dans 10 cm³ de CHCl₃ anhydre (9). On laisse 48 heures sous agitation magnétique à l'abri de la lumière. Le mélange est ensuite versé dans 100 cm³ d'éther sec qui précipite le polymère. Celui-ci est dissous dans 20 cm³ de chloroforme et reprécipité de la même façon. Après séchage dans un dessiccateur sous pression réduite, on obtient 1,7 g (70 %) de polymère 4 (solide blanc).

<u>Analyse</u>	Tr. %	C 43,66	H 6,41	Cl 24,45
----------------	-------	---------	--------	----------

Spectre I R (cm⁻¹) (KBr) : apparition d'un pic γ_{CCl} à 670.

Spectre R M N (D M S O, d₆) (ppm) : δ 5,2 (massif) (-OH et >NH)
 massif de δ 3,2 à δ 4,2
 (-CH₂OH, -CH₂N< et -CH₂Cl)
 δ 1,9 (massif) (-CH₂- de la chaîne macromoléculaire)
 δ 1,1 (massif) (-CH₃)

L'analyse et le spectre de R M N indiquent que le taux de chloration est supérieur à 60 %.

Remarques : La chloration peut être faite pendant 5 jours au lieu de 2 sans que le polymère se colore mais l'augmentation du taux de substitution entraîne une mauvaise fixation de la trypsine sur la macromolécule devenue trop hydrophobe. D'autre part, la chloration à chaud provoque rapidement une coloration du polymère.

II - IMMOBILISATION DE LA TRYPSINE

Fixation de la trypsine sur le polymère 4

On utilise le mode opératoire général suivant : dans une fiole conique de 10 cm³, on introduit une suspension de 100 mg de polymère dans 5 cm³ de solution tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2 ou 7,5. Puis on ajoute 20, 50 ou 100 mg de trypsine en maintenant l'agitation pendant 24 heures à 4°, et la suspension est centrifugée à froid. On lave plusieurs fois avec une solution de NaCl, M (total 50 cm³) puis avec de l'eau distillée (total 45 cm³) en agitant puis en centrifugeant après chaque lavage. Les filtrats sont rassemblés (total 100 cm³).

Après mesure de l'activité tryptique du dérivé insoluble obtenu, ce dernier est conservé à l'état lyophilisé.

Mesure de l'activité de la trypsine soluble

La trypsine originelle est dosée dans les mêmes conditions que la trypsine présente dans les filtrats après fixation. On dissout 20 mg de trypsine dans 5 cm³ de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2 ou 7,5, on laisse sous agitation 24 heures à 4°, puis on ajoute 50 cm³ de NaCl, M et 45 cm³ d'eau distillée. On a ainsi 20 mg de trypsine dans 100 cm³ de solution, appelée solution A. Dans un verre thermostaté à 25°, on place 0,2 cm³ (soit 1/500) de la solution d'enzyme précédente et 2,8 cm³ de solution A. On amène le pH à 8 puis on ajoute 2 cm³ de solution 0,15 M de chlorhydrate de N-benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) et on note le volume de soude 0,1 N qu'il faut ajouter en 3 minutes pour maintenir le pH constant et égal à 8 (on utilise pour cela un pH-stat Radiometer).

Mesure de l'activité de la trypsine non fixée et des combinaisons trypsine/support

On opère comme pour les solutions-étalons ci-dessus, avec soit 1/500 de la solution d'enzyme non fixée, soit 1/50 (ou 1/100) de la suspension de dérivé insoluble dans 20 cm³ de solution A.

On appelle m_1 (mg) la masse de trypsine ayant la même activité que le dérivé insoluble, m_2 (mg) la masse de trypsine non fixée présente dans les filtrats et m_3 (mg) la masse de trypsine contenue dans le dérivé insoluble et obtenue par la différence $m_3 = (\text{masse mise en oeuvre} - m_2)$ mg.

Dans ces conditions, le pourcentage d'activité résiduelle r du dérivé insoluble est donné par la relation :

$$r = 100 \left(\frac{m_1}{m_3} \right)$$

m_1 et m_2 sont déterminés à partir des solutions-étalons précédentes, connaissant le volume V de soude 0,1 N ajoutée en 3 minutes à 25°. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous dans lequel V (dérivé) et V (solution) représentent respectivement les volumes de soude ajoutés en 3 minutes lors des mesures des activités du dérivé insoluble et de la solution correspondante de trypsine résiduelle non fixée.

a) masse de trypsine mise en oeuvre : 20 mg ($m_3 = 20 - m_2$)

prise d'essai pour le dérivé insoluble : 1/50

pH de fixation		V (solution) (cm ³)	V (dérivé) (cm ³)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	m_3 (mg)	r (%)
7,2	solution-étalon	0,0420	-	-	20	-	-
	trypsine immobilisée	0,0370	0,0166	0,8	17,7	2,3	34
7,5	solution-étalon	0,0445	-	-	20	-	-
	trypsine immobilisée	0,0390	0,0245	1,1	17,5	2,5	44

b) Fixation à pH = 7,5

Prise d'essai pour le dérivé insoluble : 1/100

masse M de trypsine mise en jeu (mg)	V (solution) (cm ³)	V (dérivé) (cm ³)	m ₁ (mg)	m ₂ (mg)	m ₃ (mg)	r (%)
20	0,0390	0,0122	1,1	17,5	2,5	44
50	0,0993	0,0177	1,6	44,6	5,4	29
100	0,1025	0,0200	1,8	92,1	7,9	23

(les courbes $m_3 = f(M)$ et $r = f(m_3)$ sont données en partie théorique)

Après conservation dans NaCl, M à 4° pendant 48 heures, ces dérivés, filtrés puis remis en suspension dans la solution A, présentent la même activité qu'au départ.

Activité après incubation à 55°

On mesure à 25° avec le pH-stat, l'activité d'une solution-étalon de trypsine (20 mg dans 100 cm³ de solution A à pH 7,2) et de la suspension du dérivé obtenu par fixation à pH 7,2. On incube ces deux mélanges à 55° pendant une heure. Toutes les 15 minutes on prélève à la pipette 0,2 cm³ de solution et 0,4 cm³ de suspension dont on mesure l'activité trypsique. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Mélange étudié	Activité après incubation à 55° (%)				
	temps (mn)				
	0	15	30	45	60
solution-étalon de trypsine	100	30	18	15	12
suspension de dérivé	100	95	91	87	78

(les courbes Activité = f (t) sont données en partie théorique)

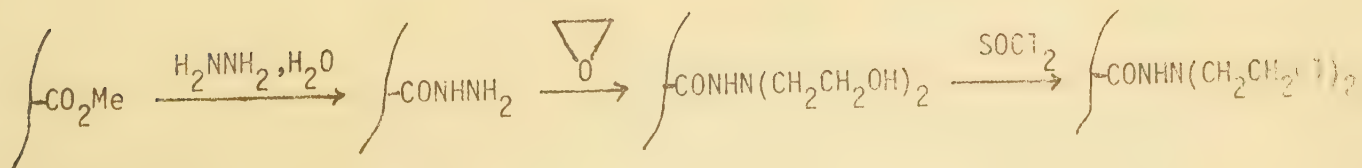
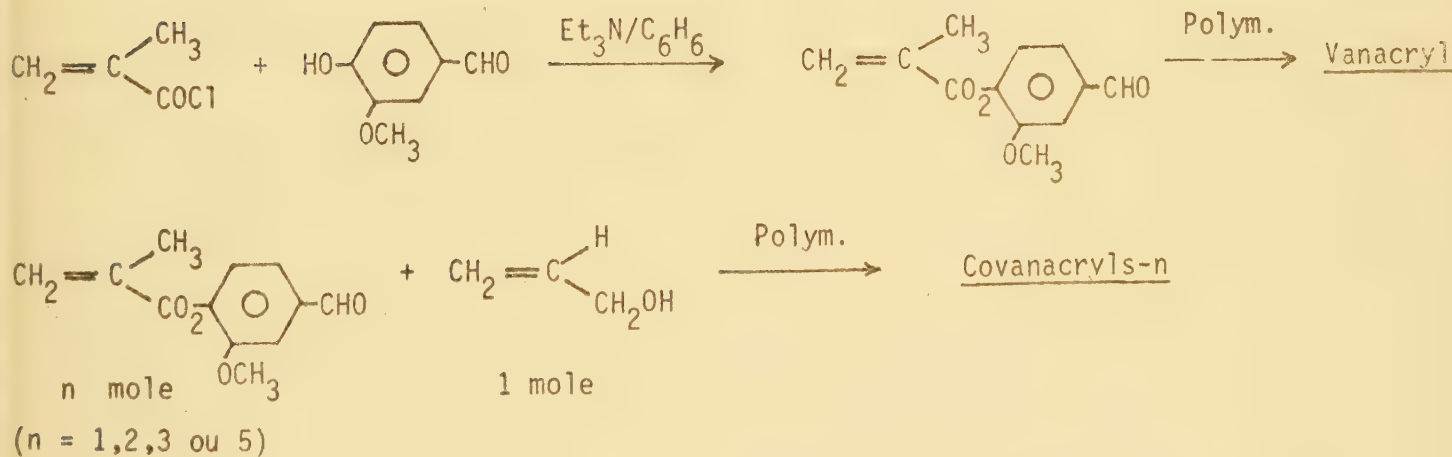
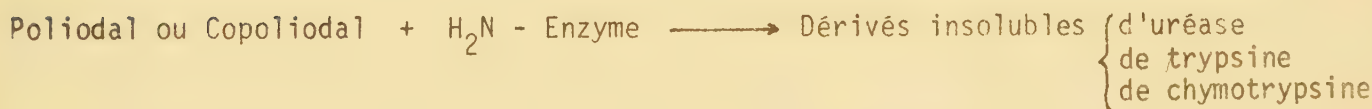
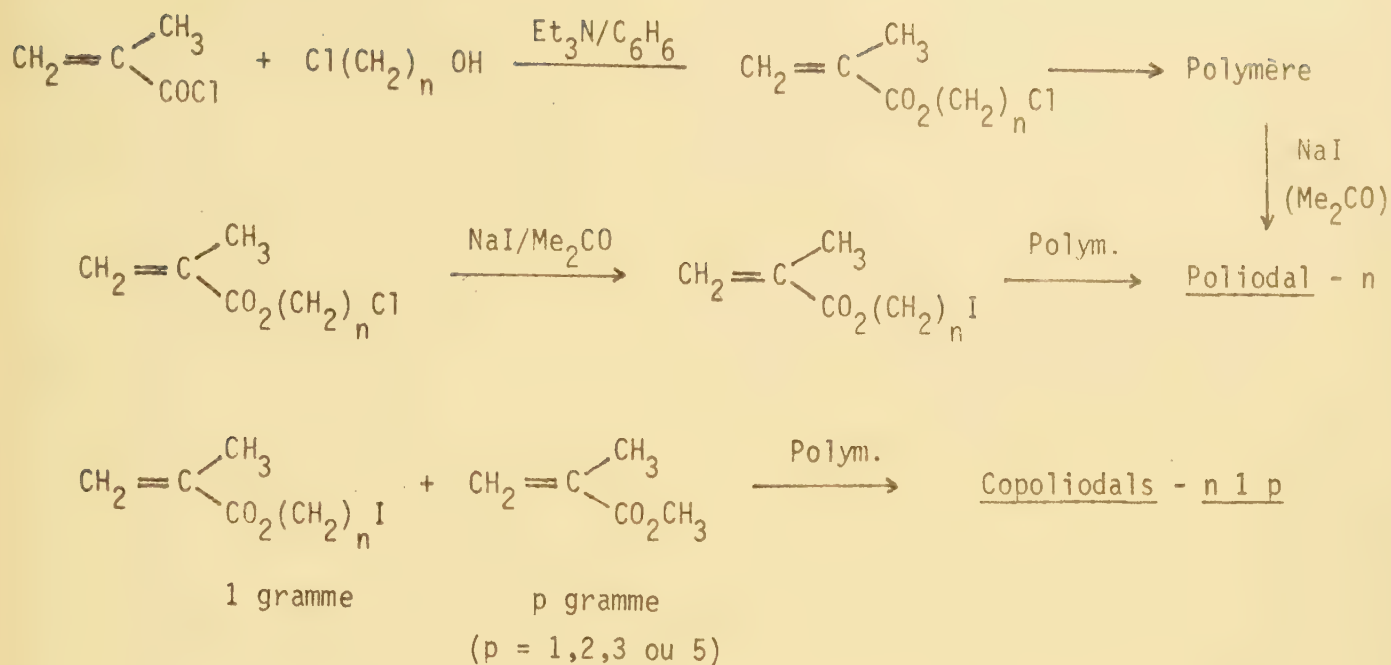
B I B L I O G R A P H I E

- 1) I. MONORU, O. TAKEYUKI et O. TADATOSHI, Kobunshi Kagaku, 1957, 15, 181.
(Chem. Abstr., 1960, 54, 954 f.)
- 2) G.I. KUDRYAVTSEV et E.A. RASSOLOVA, Khim. Volokna, 1959, n° 1, 36.
(Chem. Abstr., 1959, 53, 16 579 f.)
- 3) K. YOKOTA, Y. SAKAI et Y. ISHII, J. Polymer Sci., 1965, 3, 839.
- 4) D. HERD, J. amer. chem. Soc., 1932, 54, 1974.
- 5) V.W. KERN, Th. KUCKE, R. HOLLANDER et R. SCHNEIDER, Makromol. Chem., 1957, 22, 31.
- 6) M. ISHIDATE, Y. SAKURAI et Y. KUWADA, Chem. Pharm. Bull. (Japon), 1960, 8, 543.
- 7) R. PREUSSMANN, Arzneimittel Forsh, 1962, 12, 260.
- 8) S. BOYER et A. RONDEAU, Bull. Soc. chim., 1958, 240.
- 9) A.H. FORD-MOORE, A.G. LIDSTONE et W.A. WATERS, J. chem. Soc., 1946, 819.
- 10) F.A. BOVEY et G.V.D. TIERS, J. Polymer Sci., 1960, 44, 173.
- 11) E. BROWN, A. RACOIS et H. GUENIFFEY, Bull. Soc. chim., 1971, (12), 4341.
- 12) A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1963, 238, 1689.
- 13) R.D. LILLY, Symposium sur les protéines chimiquement greffées et réticulées, Rouen, 15 Septembre 1972.
- 14) W. BRÜMMER, N. HENNRICH, M. KLOCKLOW, H. LANG et H.D. ORTH, Europ. J. Biochem., 1972, 25, 129.
- 15) E. BROWN et A. RACOIS, Tetrahedron, sous presse.
- 16) E. BROWN et A. RACOIS, Bull. Soc. chim., 1971, (12), 4351.
- 17) P. BIEBER, Bull. Soc. chim., 1954, 56.

TABLEAU COMPARATIF DE L'IMMOBILISATION
DE LA TRYPSINE SUR DIVERS
POLYMERES REACTIFS (1)

POLYMERE	TRYPSINE FIXEE (mg/g)	A E R DES DERIVES (%)
Poliodal	15 à 36	25 à 31
Vanacryl	12 à 26	10 à 25
<u>Bis</u> (β -chloroéthyl) amino	25 à 79	23 à 44
Enzacryl - AH	40 à 45	40 à 45
Ethylène - Anhydride maléique (E M A)	35 à 75	23 à 25
Acrylamideagarose	18	143

(1) La trypsine utilisée provenait d'un même lot.



Par délibération de son Conseil en date du 10 Novembre 1972,
l'Université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux
opinions émises dans les thèses ou mémoires. Ces opinions doivent
être considérées comme propres à leurs auteurs.

Extrait du procès-verbal du Conseil de l'U.E.R. de Sciences

Décision du 16 Mars 1973

Le Conseil de l'U.E.R. de Sciences s'alarme de voir figurer à l'ordre du jour du Conseil de l'Université de ce jour Vendredi 3 Novembre 1972 le point suivant :

"délibération du Conseil de l'Université concernant les opinions émises par les candidats dans leur thèse de Doctorat".

Le Conseil de l'U.E.R. de Sciences considérant que le Doctorat d'Etat est le plus solide des titres que puisse délivrer l'Université, aucune réserve ne doit être faite quant au sérieux de son fond. On peut constater que la répercussion des thèses issues des laboratoires est un élément essentiel de leur réputation, et que réciproquement, une thèse porte à priori la caution du laboratoire où elle est produite.

C'est pourquoi l'U.E.R. de Sciences s'affirme solidairement responsable des thèses de Doctorat réalisées dans ses Départements. Le Conseil de l'U.E.R. de Sciences demande qu'aucune inscription restrictive ne figure sur les thèses de Sciences, un tel encart étant propre à discréditer à priori le travail concerné.

VU

LE MANS, 1e

Le Président de la thèse

VU

CAEN, 1e

Le Directeur de l'U.E.R. Sciences

C.P. PINAZZI

J. SIGNORET

VU

LE MANS, 1e

Le Président du Centre Universitaire

R. LEHMANN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Caen, 1e

Le Président de l'Université

J. IZARD

